

**A hősök transzkripciós faktor HSF-1 transzkripció
aktivációs szerepének feltárása a fonálféreg
Caenorhabditis elegans-ban**

36. OTDK Biológia szekció

Kovács Márton

ELTE TTK Biológia MSC, 3. félév

Témavezető: Dr. Barna János, tudományos munkatárs

ELTE TTK Genetika tanszék



2023.

Tartalomjegyzék

Összefoglaló	2
Rövidítésjegyzék	3
Bevezető	4
Célkitűzések	6
Anyagok és módszerek	7
Eredmények	9
Diszkusszió	18
Szerzői hozzájárulás	19
Függelék	20
Irodalomjegyzék	21
Köszönetnyilvánítás	22

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, karcinogenezis és tumor progresszió). A kiterjedt vizsgálatok ellenére a HSF1 működése ezekben a folyamatokban máig nem teljesen ismert.

C. elegans-ban eleddig a *hsf-1* két allélja ismert: a nullmutáns *ok600* és a transzaktivációs domént nélkülöző fehérjét kódoló *sy441*. Míg az *ok600* mutáns állatok lárvaletális fenotípust mutatnak, addig a *hsf-1(sy441)* mutáns férgek életképesek annak ellenére, hogy a bennük képződő csonka HSF-1 az irodalom szerint nem képes transzkripciós aktivációra. Ennek ellentmond kutatócsoportunk új, RNS-szekvenáláson alapuló eredménye, miszerint a *hsf-1(sy441)* mutánsban hősokkot követően mégis aktiválódnak a HSF-1 célgénjei.

Kutatásunk célja az volt, hogy ezt az eredményt kvantitatív real-time PCR és GFP riporter rendszerek segítségével validáljuk. Célunk továbbá, hogy *forward* genetikai módszerekkel olyan új *hsf-1* mutánsokat izoláljunk, amelyek életképesek, de a hősokk gének transzkripciójának aktiválására képtelenek. Ezért egy olyan transzgén rendszert hoztunk létre, melyben az embrióban apoptózist indukáló *egl-1* gén egy hősokk-promóter szabályozása alatt áll. Reményeink szerint az

ezen rendszer segítségével izolált új *hsf-1* allélok vizsgálata elvezethet a HSF-1 működésének jobb megértéséhez.

Rövidítésjegyzék

cDNS: komplementer DNS.

C. elegans: *Caenorhabditis elegans*, fonálféreg és széles körben elterjedt felhasználású genetikai modellorganizmus.

EMS: etil-metil-szulfonát, erős mutagén mely főként pontmutációkat okoz nukleotid-szubsztitúcióval.

GFP: Green fluorescent protein, *Aequorea victoria* medúzából izolált fehérje, mely UV-fényre zölden fluoreszkál. Kiválóan alkalmas egyebek között átlátszó szöveteken belül egy hozzáfuzionált fehérje lokalizációjának megállapítására.

HSE: *heat-shock responsive element*, konzervált regulátor szekvencia.

Hsf-1: *heat-shock factor 1*, hősokk transzkripció faktor 1.

Hsp: *heat-shock protein*, hősokkfehérje.

Hsp-16: *heat-shock protein 16*, egy hsf-1 dependens hősokkfehérje.

Hsp-70: *heat-shock protein 70*.

Hsp-90: *heat-shock protein 90*, egy molekuláris chaperon, mely képes a *hsf-1*-et inaktiválni annak megkötésével.

LB: *Luria-Bertani broth*, *Escherichia coli* növesztésére alkalmas táptalaj, mely használható mind folyékonyan, mind szilárdan agar hozzáadásával.

M9: fiziológiai oldat *C. elegans* számára.

N2: vad típusú *C. elegans*.

NGM: *Nematode Growth Medium*, a *C. elegans* fenntartására kiválóan alkalmas, agar-alapú táptalaj.

PCR: polimeráz láncreakció, egy adott nukleotidszakasz felsokszorozására használt bevett eljárás.

QPCR: kvantitatív polimeráz láncreakció.

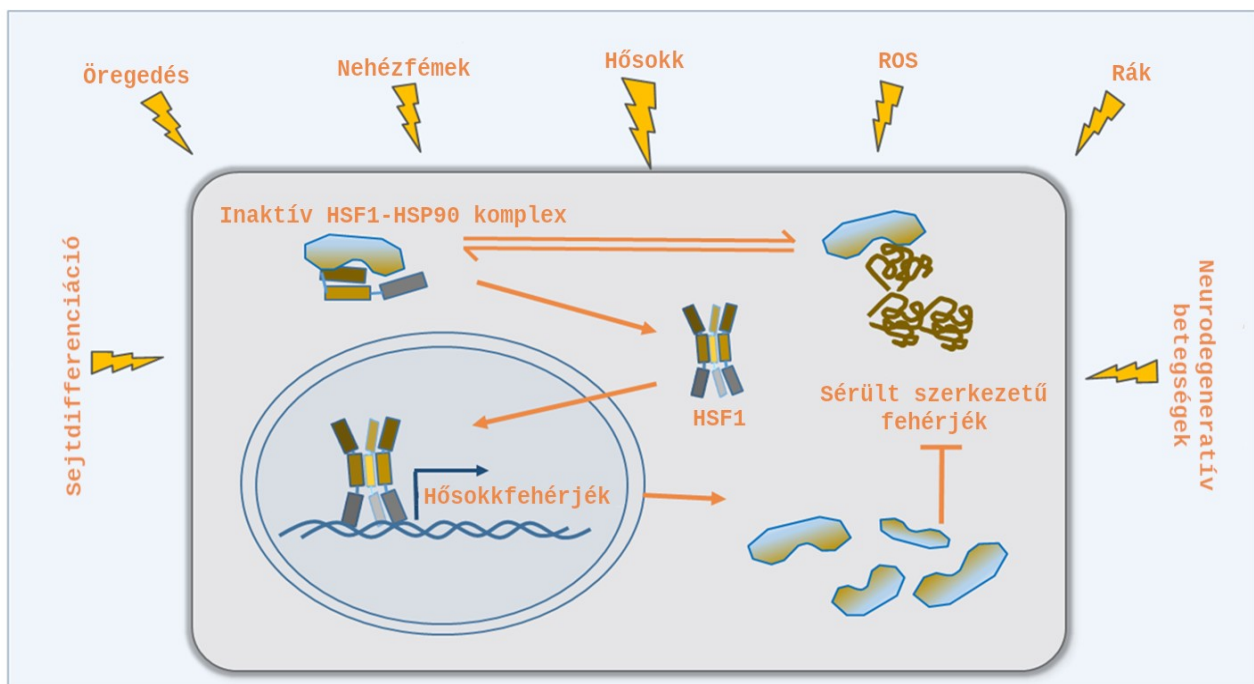
Unc: *uncoordinated*.

Wt: vad típus. A konszenzusos 'természetbeli, módosítatlan' állapot.

Bevezető

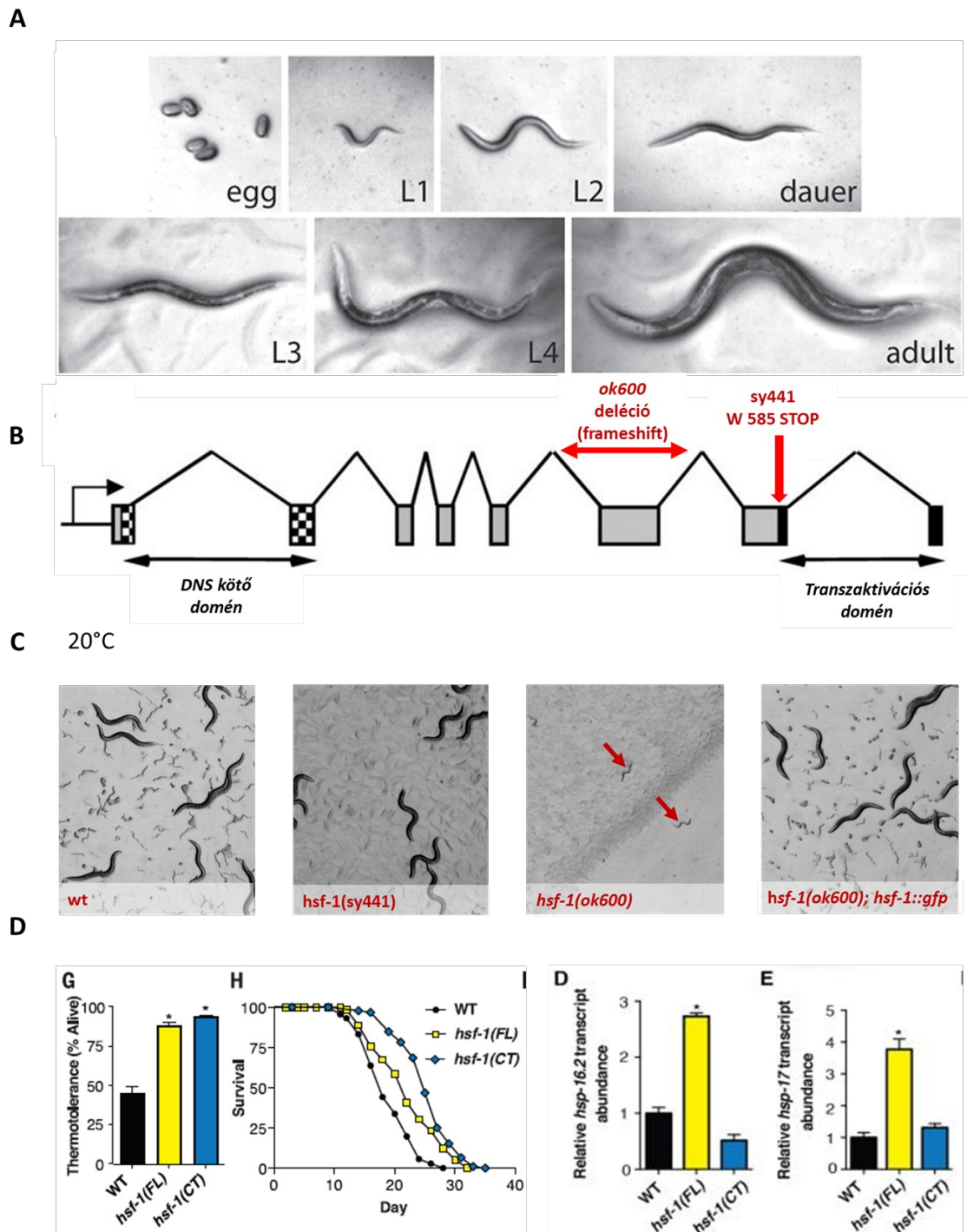
Élete során egy sejtet számos stresszhatás érhet – éhezés, oxidatív stressz, extrém külső kémhatás, szalinitás vagy hőmérséklet, csak hogy néhányat említsünk - melyekre a túlélés érdekében megfelelő választ kell adnia. Ezek közül nem egy a fehérjék működését gátolja azok térszerkezetének megbontásával és részleges vagy teljes denaturálásával, mely nemcsak a fehérje normális funkcióját akadályozza, de gyakran még akár toxikus is lehet az élőlény számára. Az ilyen proteotoxikus stressz elleni védekezési mechanizmusok egyike a hősokkválasz, mely során a stresszhatást érzékelve különböző dajkafehérjék (chaperonok) transzkripciója aktiválódik, melyek aztán megkísérlik a sérült fehérjét visszahajtogatni rendes konformációjukba, illetve ha ez nem sikerül, akkor kijelölni őket lebontásra (1, 8).

A folyamat során aktiválódó chaperonokat szokás hősokkfehérjéknek (*heat shock protein*, röviden *hsp*) hívni, míg az őket aktiváló transzkripciós faktorok a hősokkfaktorok (*heat shock factor*, rövidítve *hsf*). A dolgozatban tárgyalt *hsf-1* (*heat shock factor 1*) evolúciósan erősen konzervált, homológja emberben, egérben, ecetmuslicában és zebradánióban csakúgy megtalálható, mint a fonálféreg *C. elegans*-ban. Normál esetben a *hsf-1* a *hsp-90*-el alkotott represszor komplexben van megkötve, ahonnan proteotoxikus stressz hatására szabadul fel, s trimerizálódva a sejtmagba transzlokálódik, ahol emígyen aktív transzkripciós faktorként képes a hősokkfehérjék génjeinek aktiválására egy jelentősen konzervált regulátorhoz, a HSE motívumhoz (*heat shock responsive element*) kötve (7) [1. Ábra].



1. Ábra: A HSF-1 általános működése jelenlegi ismereteink szerint, Akerfelt et al. nyomán (7).

Caenorhabditis elegans-ban jelenleg két mutáns allélje ismert a *hsf-1*-nek: az *sy441* és az *ok600*. A *hsf-1(sy441)*-ről bár átíródik fehérje, az C-terminálisan trunkált, nincsen rajta a



2. Ábra: Áttekintő. A) A *Caenorhabditis elegans* fejlődési stációi. B) A *C. elegans* *hsf-1* gén szerkezete, az *ok600* deléció és az *sy441* korai stopkodon pozíciójának bejelölésével. C) A két ismert *hsf-1* mutáns látható fenotípusa, illetve a *hsf-1(ok600)* menekítése. D) Termotolerancia ill. élethossz összefüggése a *hsf-1*-el. WT=vad típus, *hsf-1(FL)*=túlexpresszált teljes hosszúságú *hsf-1*, *hsf-1(CT)*=C-terminálisan trunkált *hsf-1*. (2, 9, 10)

transzaktivációs domén. Ennek ellenére azonban az ezen genotípussal rendelkező állatok továbbra is életképesek. Ezzel szemben a *hsf-1(ok600)* egy korai stopkodont tartalmaz, s lárvakorban rekedéshez majd pusztuláshoz vezet (10). Ez a kettősség afelé enged következtetni, hogy a *hsf-1*-nek kell, hogy legyen valami egyéb, létfontosságú szerepe vagy egy alternatív mechanizmus, mely feltételezést korábbi kísérletek is megerősíteni látszanak: túltermeltetése ugyanis, legyen bár a teljes fehérje, vagy csak a transzaktivációs doméntól mentes trunkált változata, képesnek adódott a termotolerancia illetve az élethossz növelésére (9) [2. Ábra], illetve érdekes módon úgy tűnik, az egyedfejlődés során is lehet valami feladata, mint ahogy azt *Drosophila melanogaster*-ban találták (11), ráadásul az élethosszra gyakorolt hatástól valószínűleg függetlenül mivel a szöveti feltételek különböznek (16). *Mus musculus*-ban neuroblasztómák elleni protektív hatását figyelték meg túltermeltetés esetén (3). Összefoglalva szerepeit különböző folyamatokban, eddigi ismereteink szerint működése valamely szinten a proteotoxikus stressztől való védelmen kívül – vagy tán épp miatta? - összefonódhat olyan jelenségekkel, mint az öregedés (7), neurodegeneratív betegségek (3), és a rák (4, 5).

Célkitűzések

Kutatócsoportunk nemrégiben RNS-szekvenálás segítségével arra a megdöbbentő eredményre jutott, hogy a transzaktivációs domén nélküli trunkált fehérjét kódoló *hsf-1(sy441)* mutánsban hősokkot követően mégis aktiválódnak a HSF-1 célgénjei.

Munkám elsődleges célja az volt, hogy ezen az eddigi irodalommal szembemenő eredmény megbízhatóságát az RNS szekvenálási adatok mélyebb elemzésével ellenőrizzük, továbbá a kapott eredményt az RNS szekvenáláshoz felhasznált minták, illetve újonnan izolált RNS minták felhasználásával qPCR vizsgálat és a *hsp-16.2::gfp* riporter-rendszer segítségével validáljuk.

A kutatási területen kulcsfontosságú annak feltárása, hogy a HSF-1 betölt-e olyan funkciót az egyedfejlődésben, illetve stresszválasz során, amely független a HSF-1 transzkripciót aktiváló funkciójától, ezért további célom az volt, hogy egy olyan fonálféreg törzset állítsak elő, amely lehetővé teszi, hogy *forward* genetikai módszerekkel a *hsf-1* gén új, transzaktivációra képtelen, de életképes mutánsait izolálhassuk.

Anyagok és Módszerek:

Általános fenntartás: Az állatok fenntartása ahol nincs külön jelezve 20°C-on, NGM-et (*Nematode Growth Medium*) tartalmazó Petri-lemezeken történt, amire az uracil auxotróf *Escherichia coli* OP50 baktériumtörzset pázsitként szélesztettük.

Primerpár megnevezése	Forward szekvencia (5'→3')	Reverse szekvencia (5'→3')
<i>egl-1</i> klónozó primer	TATTGGATCCCACACCCAAAAC ATTCACACCG	TATTGAGCTCTCGAAGCCCTCAT TCCCAAT
<i>hsf-1(sy441)</i> szekvenáló primer	AAATTTTCAGCCGAACAAG	TTTTCCGGGTACTGTTGCTC
<i>hsp-70 A</i> qPCR primer	CGGTATTTATCAAAATGGAAAG GTT	TACGAGCGGCTTGATCTTTT
<i>hsp-70 B</i> qPCR primer	TGCACCAATCTGGACAATCT	TCCAGCAGTTCCAGGATTTC
<i>hsp-16.2</i> qPCR primer	TCCATCTGAGTCTTCTGAGATTG TTA	TGGTTTAAACTGTGAGACGTTG A
<i>hsp-16.11</i> qPCR primer	GGCTCAGATGGAACGTCAA	GCTTGAACTGCGAGACATTG
<i>cdc-42</i> qPCR primer	TGGAGAGAAGTTGGCAAAGG	TGTTGTGGTGGGTCTGAGAG

Hő sokkolás: Hő sokkoláshoz a törzseket előzetesen szinkronizáltuk, törzsenként 6-8 lemezre, lemezenként 10-10 petéző felnőtt vagy L4 állapotú hermafrodita kirakásával, melyeket változó ideig petézni hagyunk, amíg hozzávetőleg lemezenként 60 petét nem raktak; ez az idő a *hsf-1(sy441)* törzseknél azok peterakási rendellenessége miatt olykor hosszabb volt (2). A petéztetést követően a felnőtt állatokat eltávolítottuk a lemezekről, így csupán a közelítőleg egykorú peték maradtak egy lemezen. Ha a férgek elérték a fiatal felnőttkort (20°C-on 3-4 nap), a lemezek felét kontrollként 20°C-on növesztettük tovább, ám a másik felét fél órán át 35°C-on hő sokkoltuk, majd egy órán át 20°C-on tartottuk, ezt követően pedig mind a kontroll, mind a hő sokkolt lemezekről M9 oldattal lemostuk az állatokat, s -80°C-on tároltuk felhasználásig. A *hsp-16.2::gfp* és a *hsf-1(sy441)x4; hsp-16.2::gfp* törzsek esetében a fél órás 35°C-os hő sokkot követően a 2-4 órán keresztül 20°C-on tartottuk.

Bleaching: A peték és kikelt állatok elkülönítésére alkalmas eljárás, melynek alapja, hogy a peték vastagabb kutikulájuk miatt jobban bírják, ha egy nátrium-hidroxidos-hipós oldattal kezelik őket. Eljárásunk során 1:1:2 arányban kevert nátrium-hidroxid:hipó:víz oldatban fürdettük az előzőleg a lemezekről M9-el lemosott állatokat, amíg a felnőtt állatok el nem kezdtek szétesni, ha szükséges vortexeléssel rásegítve a folyamatra. Ezután az állatokat centrifugával ülepítjük és háromszor M9-el átmoszuk, majd a kívánt médiumba átvihetők a peték.

RNS-izolálás: A hősokkolt és lemosott egyedeket RNazol oldatos eljárással kezeltük (*MRC RNazol RN190*, a gyártó protokollja szerint), a feltárást háromszori folyékony nitrogénben lefagyasztással, majd vortexelés közbeni felolvasztással végezve, majd a *Zymo Research* RNS-izoláló kitjével oszlopon tovább tisztítva a gyártó protokollját követve, Dnáz I-es kezeléssel egybekötve izoláltuk a teljes RNS-tartalmat. A kapott mintákat -80°C-on tároltuk.

cDNS-írás: Az RNS-mintákból cDNS-t (komplementer DNS-t) a *RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit*-tel (*Thermo Scientific, K1621*) írtunk, a gyártó protokollját követve, *Mastercycler Nexus PCR Machine* (*Eppendorf*) PCR-készülékben. A cDNS-t tömény állapotban -20°C-on tároltuk, a további kísérletekben, ahol szóba kerül, 20x-os hígítását használtuk.

PCR: Taq-polimerázos polimeráz láncreakció a *DreamTaq DNA Polymerase* (*Thermo Scientific, EP0702*) gyártói protokollját követve és az éppen szóban forgó primereket használva *Mastercycler Nexus PCR Machine* (*Eppendorf*) PCR-készülékben.

Sanger-szekvenálás: az *Eurofins* szolgáltatását használtuk, a minták előzetes összeállítása során a protokolljukat követve.

Használt törzsek: N2 (*Bristol*) vad típusú, PS 1740 *hsf-1(sy441)* és TJ 375 *hsp-16::gfp* törzseket a CGC törzsbankból szereztük be. Egy négyszeresen kikeresztett TTV 450 *hsf-1(sy441)x4* valamint a *hsf-1(sy441)x4; hsp-16.2::gfp* törzset laboratóriumunkban korábban hozták létre. A transzgénikus törzs elkészítésének alapját szintén a törzsbankból beszerzett DP 38 *unc-119(ed3)III* szolgáltatta.

Integrációs teszt: Transzgénikus állatok esetén annak eldöntésére, hogy a transzgén genomilag integrált, vagy csupán extrakromoszomális (és így instabil helyzetű), viszonylag egyszerű módszer, ha több, az itteni esetben 8-8 lemezre kiteszünk egy-egy petéző hermafroditát a vizsgálni kívánt vonalból. A módszer elve, hogy amennyiben a transzgén nem integrált, úgy az *unc-119* állatok menekítése a kotranszformációs marker *unc-119(+)* transzgén által nem minden utódban történik meg a menekítő gén random elvesztése miatt, s így az utódok között Unc fenotípusú, paralizált állatokat is lelünk majd. Annak az esélye, hogy 8 esetben is egy integrált vonalból véletlenszerűen a transzgénre heterozigóta állatokat válasszunk ki elenyésző (4%), ezért az ilyen törzseket instabilnak tekintjük.

RT qPCR: A *Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X)* (*Thermo Scientific, K0221*) felhasználásával, *Roche Lightcycler 96* készülékben a gyártói protokollnak megfelelően, 20 mikroliter végtérfogatban.

Plazmid izolálás baktériumból: a *GeneJET Plasmid Miniprep kit* (Thermo Scientific, K0502) használatával, a protokollt követve végeztük.

DNS-izolálás *C. elegans*-ból: *single worm lysis* módszerrel a lízis pufferhez proteináz-K enzimet adunk, s ebben az oldatban lizáljuk az állatot egy órán át 60°C-on, majd 15 perc 95°C-al inaktiváljuk az enzimet, az egész folyamat PCR-készülékben fut.

DNS-izolálás agaróz gélből: *GeneJET Gel Extraction Kit* (Thermo Scientific, K0691) használatával, a gyártói protokollt követve.

Transzgénikus állatok létrehozása biolisztikus transzformációval: A szinkronizált *unc-119* állatokat M9 oldattal lemosva és egy előhűtött és jégen tartott NGM lemezre összegyűjtjük. A linearizált konstrukciót a kotranszformációs marker *unc-119(+)*-et tartalmazó konstrukcióval (*pRH21*) együtt kötjük fel az arany szemcsékre. Az *unc-119* gén vad típusú példánya ugyanis menekíti az Unc fenotípust, s így az elsődleges *screen*-ek során, ahol ez a jól látható fenotípus eltűnik, ott feltételezhetjük, hogy nagy valószínűséggel a másik transzgén is bekerült, így őket lesz érdemes a továbbiakban vizsgálni és ezt validálni. Az előkészülethez mind a konstrukciót, mind a *pRH21*-et enzimatikusan linearizáljuk, és arany szemcsére kötjük, majd *PDS-1000/He* (BioRad) rendszerrel juttatjuk be az állatokba.

Mikroszkópos képek készítése: Az összes kép Zeiss AxioImager Z1 epifluoreszcens mikroszkóppal készült.

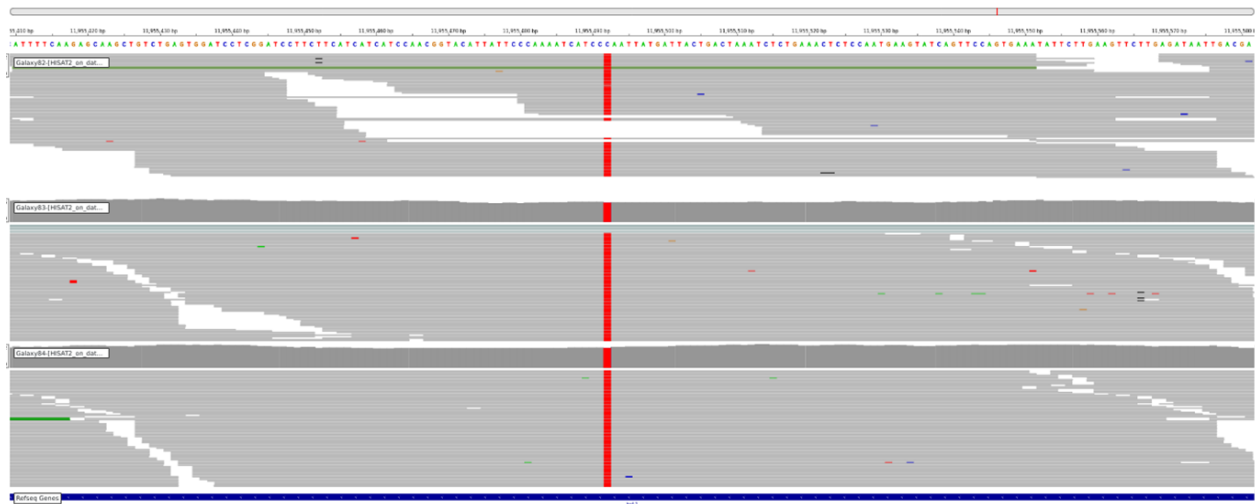
Eredmények

1. Az *sy441* allél által kódolt HSF-1 transzkripció aktivitásának vizsgálata

Kutatócsoportunk a közelmúltban vad és *hsf-1(sy441)* mutáns háttérben RNS szekvenálással vizsgálta meg fiatal felnőtt férgekben, hogy hősokk (30 perc 35°C) hatására mely gének transzkripciója HSF-1 függő. Ennek a még publikálatlan vizsgálatnak az eredménye azt mutatta, hogy számos hősokkfehérjét kódoló gén transzkripciója *hsf-1(sy441)* mutánsban is aktiválódott. A szakirodalom szerint ez az allél olyan csonka HSF-1 fehérjét kódol, amelynek transzkripciót aktiváló doménja egy nonszensz mutáció következtében hiányzik (9).

A váratlan és megdöbbentő eredmény láttán fontosnak láttuk, hogy a vizsgálathoz felhasznált mintákat újraellenőrizzük annak a lehetőségnek a kizárására, hogy a minták nálunk a laboratóriumban vagy a szekvenálást végző *Novogene* cégnél keveredtek-e el. Ennek érdekében elsőként cDNS-t írtam át a céghez elküldött RNS minták replikáiból, majd PCR segítségével *hsf-1*-specifikus primerpárt használva amplifikáltam a mintákból azt a régiót, amelyben az *sy441* alléra jellemző mutáció található, és az így kapott PCR terméket Sanger-módszerrel megszekvenáltattam. Az eredmény alapján elmondható, hogy a minták valóban a vad, illetve a *hsf-1(sy441)* mutánsokból izolált törzsekre jellemző szekvenciájú RNS-t tartalmaztak.

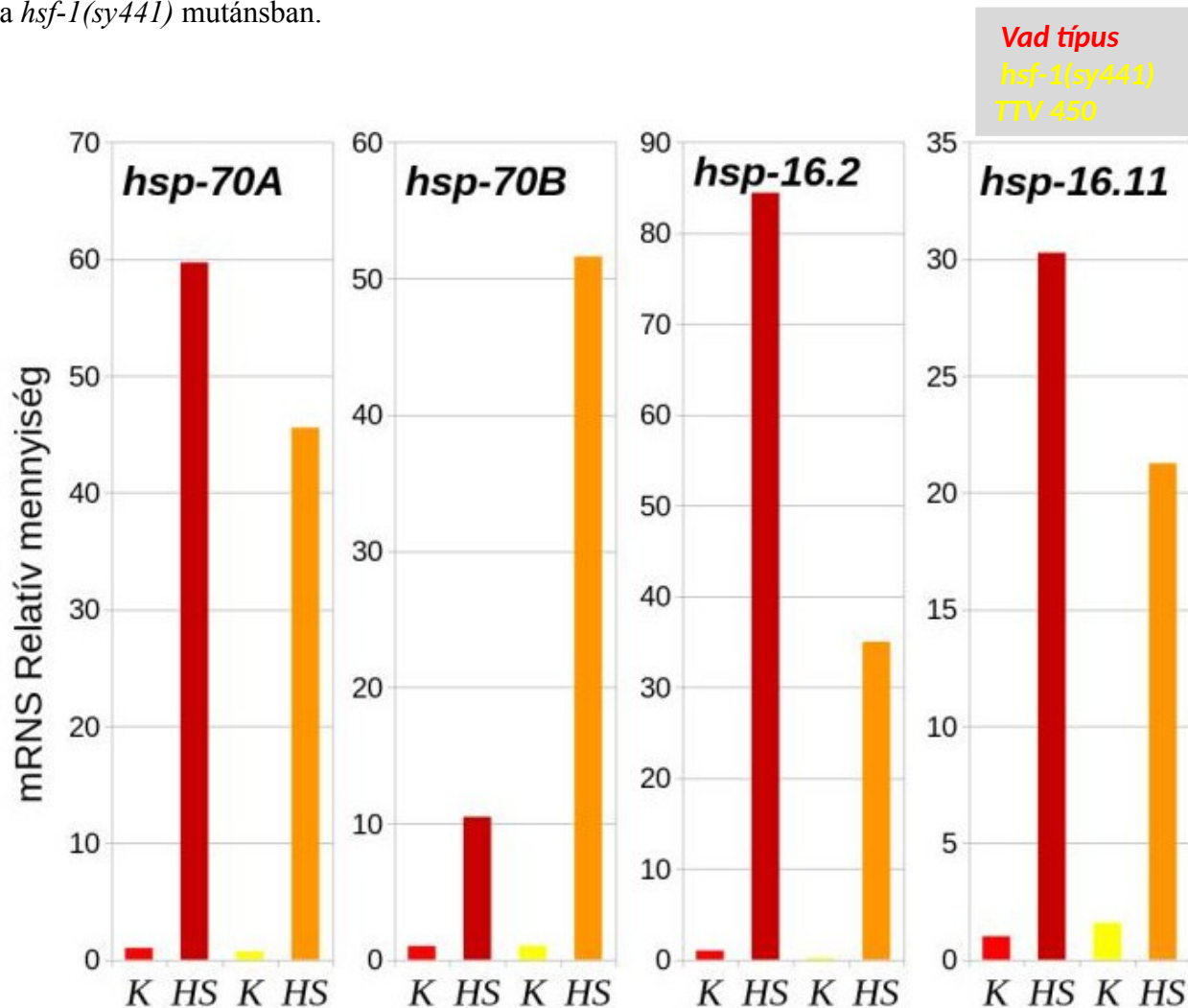
Annak érdekében, hogy a cég hibáját is kizárjuk, elvégeztük az RNS szekvenálás nyers, *Binary Alignment Map* (BAM) fájlainak elemzését is, és azt találtuk, hogy a vad mintákból származó szekvenciák a vad típusra jellemző szekvenciát, míg a mutánsokból származó minták a mutánsra jellemző pontmutációt tartalmazták [3. Ábra], vagyis a cégnél sem keveredett el a minta.



3. Ábra: A megszekvenált RNS-ek a *hsf-1* génhez való illesztésének grafikai ábrázolása: Az *Integrative Genomics Viewer* segítségével létrehozott ábrán hősokkolt *hsf-1(sy441)* mutánsból származó 3 biológiai párhuzamos mintában látható az RNS-ek illesztése a *hsf-1* lókuszhhoz. A piros sáv azt a régiót mutatja, amely nem egyezik a vad típusú *hsf-1* szekvenciájával. Ebben a pontban a *hsf-1(sy441)* allélra jellemző C → T nukleotid szubsztitúció figyelhető meg.

Ezt követően kvantitatív *real-time* PCR segítségével megvizsgáltam, hogy a céghez elküldött mintákban hogyan változik a hősokk gének mRNS szintje a hősokk hatására vad és *hsf-1(sy441)* mutáns háttérben, kontrollnak a *cdc-42* háztartási gént használva és a *hsp-70A*, *hsp-70B*, *hsp-16.2* és *hsp-16.11* géneket mérve. A kapott eredmények szerint az összes vizsgált hősokk gén (*hsp-16.2*, *hsp-70A*, *hsp-16.11*) mRNS szintje a *hsf-1* mutáns háttérben bár kissé enyhébb

mértékben, de jól láthatóan megemelkedett [4. Ábra]. Érdekes módon a *hsp-70B* estében a *hsf-1(sy441)* háttérben a hősokk hatására bekövetkező expresszió nagyobb mértékű volt, mint a vad típusban. Mindezek arra utalnak, hogy a HSF-1 C-terminálisan trunkált változata valamilyen módon mégis képes aktiválni a hősokkgének expresszióját. Elképzelhető ugyanakkor az is, hogy valamilyen kompenzációs mechanizmus következtében indukálódik a hősokkgének expressziója a *hsf-1(sy441)* mutánsban.



4. Ábra: A hősokk gének expressziója *hsf-1(sy441)* háttérben is megemelkedik hősokkot követően: A *hsp-70 A*, *hsp-70 B*, *hsp-16.2* és *hsp-16.11* mRNA szintjének változásának mértékét az RNS szekvenáláshoz felhasznált, de féltett RNS-ből írt cDNS templáton végzett qPCR segítségével határoztam meg. A qPCR méréseket mintánként 3 technikai párhuzamossal végeztem el. K=kontroll, HS=hősokkolt. A mért Cq értékek táblázatban csatolva (Függelék, 1. Táblázat).

Mindezen vizsgálatok megerősítették az RNS szekvenálással kapott eredményeinket. Fontos megjegyezni ugyanakkor, hogy az általunk vizsgált TTV 450 *hsf-1(sy441)* törzs nem egyezik meg teljesen a szakirodalomban használt törzzsel, ugyanis évekkel ezelőtt az eredeti PS 1740 törzset kutatócsoportunkban háttérmutációt gyanítva négyszeresen visszakeresztették vad típusú állatokkal, felmerülhet annak a lehetősége, hogy vagy az eredeti PS 1740 törzs, vagy a kikeresztett TTV 450 olyan háttérmutációt tartalmaz, amely befolyásolja a hősokk-indukált génexpressziót, ezért a qPCR vizsgálataimat megismételtem vad, PS 1740 és TTV 450 törzsekből izolált RNS-ek segítségével is. Ehhez a törzseket szinkronizáltam és hősokkoltam a fentebb leírtaknak megfelelően, majd RNS-t izoláltam, abból cDNS-t írtam, melyből hígítási sort készítettem 20x, 41x, 60x és 180x hígításokkal, s a qPCR-t ezek közül a 20-szoros hígításokból

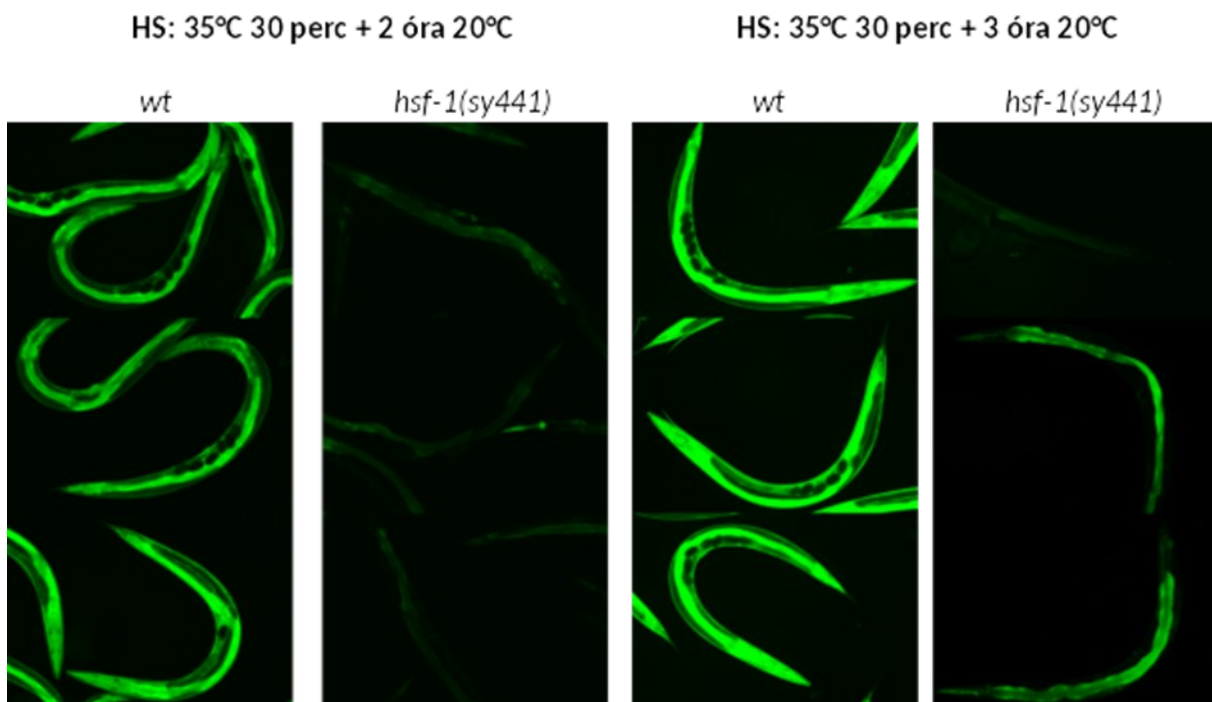


5. Ábra: *hsp-70A*, *hsp-70B*, *hsp-16.2* és *hsp-16.11* mRNS szint változása N2, kikeresztett TTV450 *hsf-1(sy441)x4* és törzsbanki PS1740 *hsf-1(sy441)* esetében, az N2 kontrollhoz viszonyítva: A qPCR méréseket mintánként 3 technikai párhuzamossal végeztem el. K=kontroll, HS=hősokkolt. A mért Cq értékek táblázatban csatolva (Függelék, 2. Táblázat).

állítottam össze, ugyanazon kontrollal és ugyanazon géneket vizsgálva mint korábban. A qPCR-rel kapott eredményeket végül a Pfaffl és kollégái által kidolgozott módon értékeltem (13).

Az eredmények azt mutatták, hogy az eredeti kikeresztezett PS 1740 törzsben jóval kisebb mértékű, de látható növekedést mutat a hősokkgének mRNS-szinje hősokkot követően, mely alapján úgy tűnik, hogy a két törzs valószínűleg különböző genetikai háttere befolyásolja a hősokkra adott transzkripció válaszukat [5. Ábra].

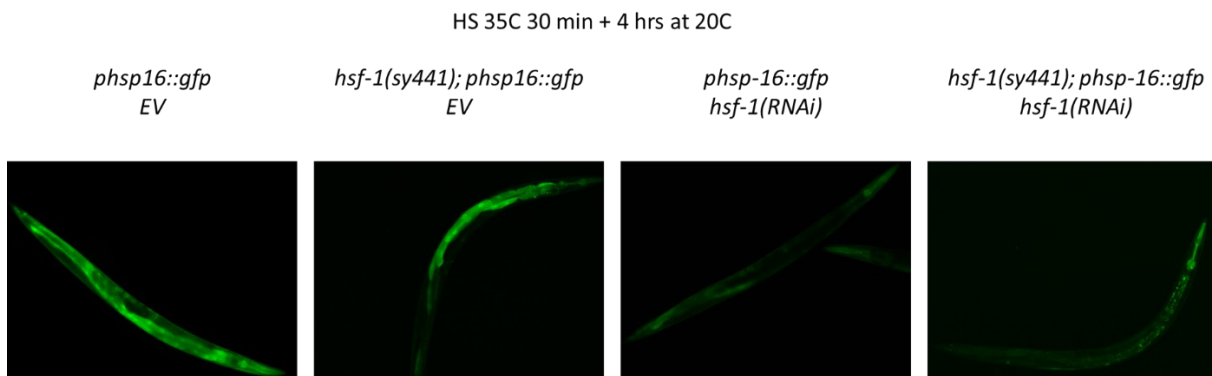
Ezt követően egy a *hsp-16.2* promóterével meghajtott *gfp*-t tartalmazó törzs (*phsp-16::gfp*) segítségével is megvizsgáltuk a hősokk hatását vad illetve *hsf-1*(*Sy441*) háttérben, az expressziós mintázat lokalizációját emígyen fluoreszcens mikroszkóppal figyelve. Vizsgálataink azt mutatták, hogy hősokk hatására a *hsf-1* mutáns háttérben a *gfp* intenzitása a hősokkot követő 2. és 3. órában elmarad a vad típusban tapasztalttól, ugyanakkor a 3. órában már jelentős expressziós változás tapasztalható a hősokkolt *hsf-1*(*sy441*) állatok többségében a nem hősokkolt kontrollhoz képest [6. Ábra]. Megjegyzendő, hogy az 6. ábrán a nem hősokkolt törzsek expresszióját nem mutatom be, mivel ezekben gyakorlatilag nem fejeződik ki a riporter. A képet tüzetesebben megvizsgálva feltűnik, hogy a *hsf-1* mutánsokban elsősorban a bélsejtekben



6. Ábra: A *phsp-16::gfp* riporter expressziójának változás hősokkolás után vad (N2) és TTV450 *hsf-1*(*sy441*)^{x4} mutáns háttérben: Jól megfigyelhető, hogy a a *hsp-16::gfp* riporter hősokk hatására még a *hsf-1* (*sy441*)^{x4} egyedekben is indukálódik, különösen a bélben. A képek Zeiss AxioImager Z1 epifluoreszcens mikroszkóppal készült 10X-es objektívvel, az expozíciós idő egységesen 50 ms.

növekedik meg a riporter kifejeződése, ami felveti annak a lehetőségét, hogy az *sy441* mutációnak valamilyen szövetspecifikus hatása lehet.

Annak eldöntéséhez, hogy transzkripcionálisan aktív HSF-1 hiányában a hősokkfehérjék expressziója valamilyen kompenzációs mechanizmusnak köszönhetően indukálódik-e a hősokk hatására, megvizsgáltuk, hogy *phsp-16::gfp* riporter hősokk-indukálta expressziós növekedése szuppresszálható-e a *hsf-1* gén csendesítésével, melyhez egy korábban elkészült *hsf-1* RNSi konstrukciót használtunk fel (14). Azt tapasztaltuk, hogy *hsf-1(sy441); hsf-1(RNAi)* állatokban a *hsp-16.2::gfp* expresszió szinte teljesen eltűnt 4 órával a hősokkot követően [7. Ábra]. Ez arra utal, hogy a *hsf-1* géntől független mechanizmus nem játszik szerepet a *hsf-1(sy441)* mutánsban bekövetkező hősokk-indukálta expressziós válaszban.

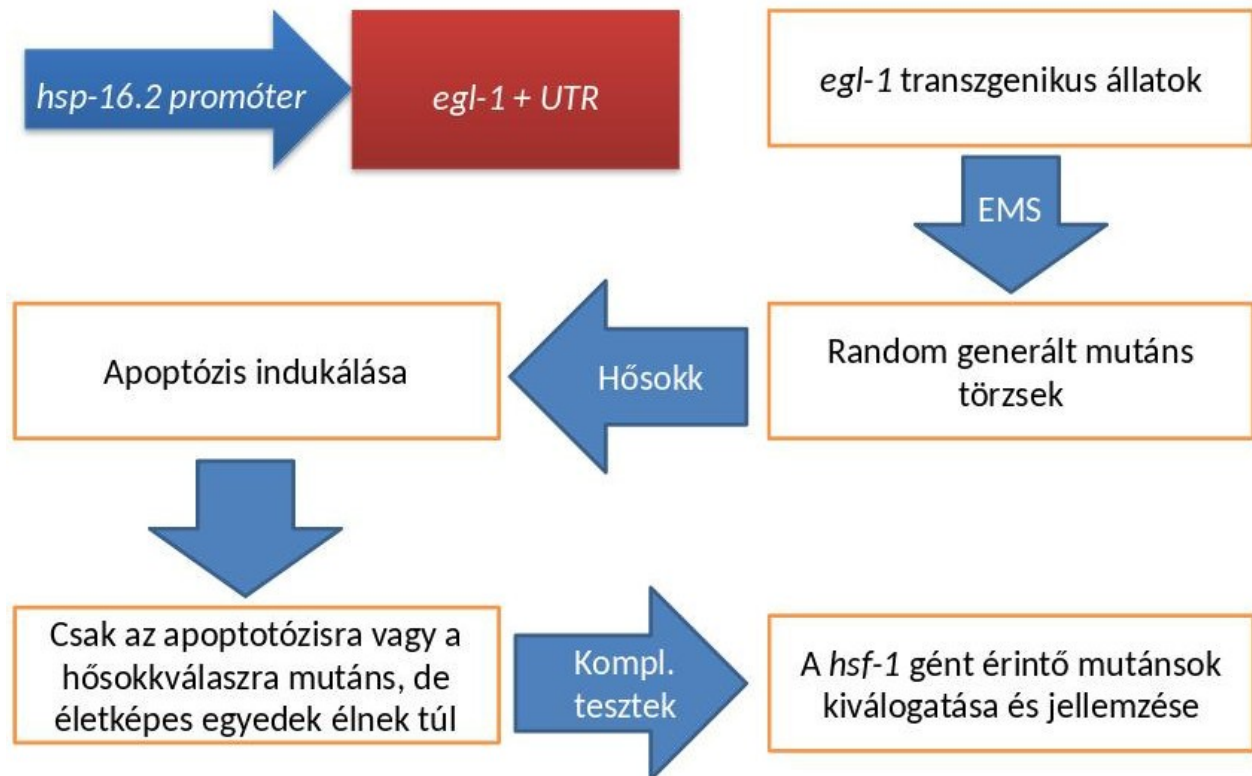


7. Ábra: *phsp16::gfp* riporter hősokk indukált expresziója *hsf-1(sy441)x4* mutáns háttérben *hsf-1*-re célzott RNS-interferenciával csendesíthető: A képek Zeiss AxioImager Z1 epifluoreszcens mikroszkóppal készült 10X-es objektívvel, az expozíciós idő egységesen 50 ms.

2. A *phsp-16::egl-1* transzgenikus törzs létrehozása

A fonálféreg *C. elegans*-ban a HSF-1 eddig ismeretlen funkcióinak megismerésének gátat szab, hogy eddig csupán a *hsf-1* gén két allélja ismeretes, a bevezetőben ismertetett *sy441* és az *ok600*. Mivel az előző fejezetben leírt eredményeink alapján úgy tűnik, hogy az *sy441* allél által kódolt csonka HSF-1 mégis képes célgénjei transzkripcióját aktiválni, felmerült, hogy kutatócsoportunk megpróbál olyan új *hsf-1* mutánsokat izolálni EMS (etil-metil-szulfonát) mutagenézissel, melyek hősokkfehérjék transzkripcióját aktiválni képtelenek, ám az állatok mégis életképesek. Ennek érdekében létrehoztam egy olyan konstrukciót, amelyben az apotózt indukáló *egl-1* gén (12) a *hsp-16* promóterének szabályozása alatt áll [8. Ábra], melyhez izolált genomi DNS-ből PCR segítségével hoztam fel a *C. elegans* saját *egl-1*-ét, melyet gélelektroforézist követő gélizolálással tisztítottam, majd ezt egy pPD49.78 vektorba ligáltam,

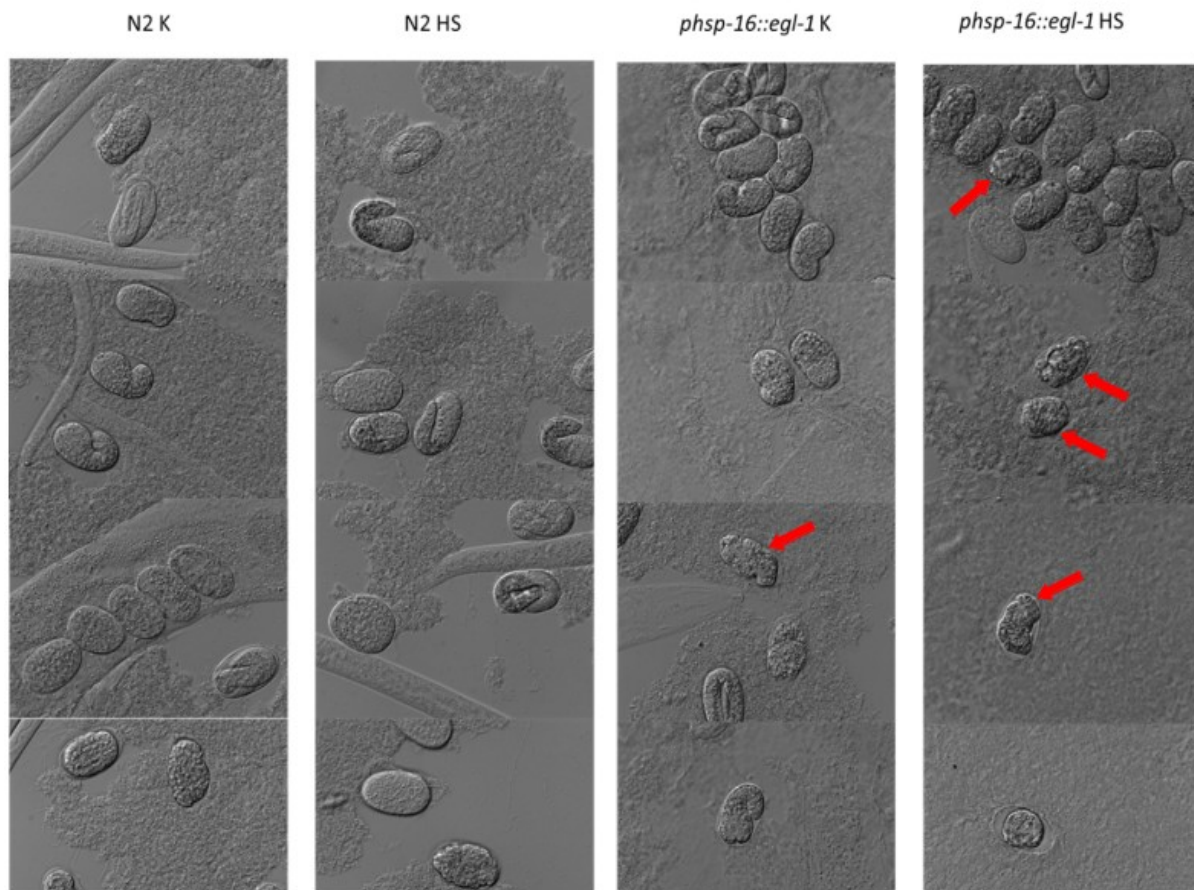
szinkronizált *unc-119* állatokba, melyek közül aztán az *uncoordinated* fenotípustól menekített utódokat vittem tovább.



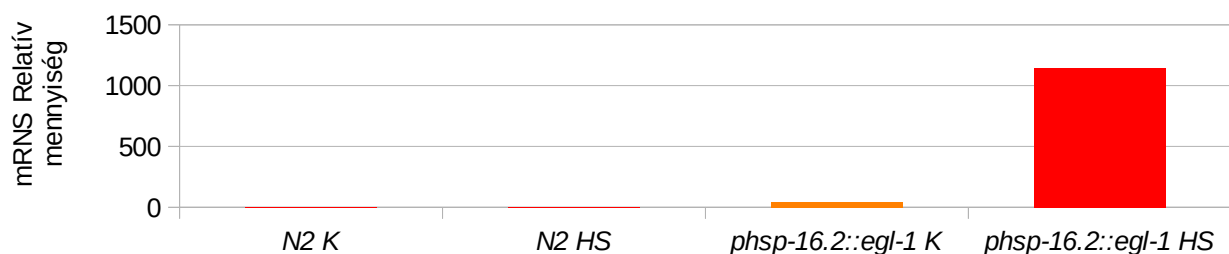
9. Ábra: A mutagenezéshez használt konstrukció illetve a mutagenesis folyamatának vázlatos ábrázolása.

Ezidáig 18 potenciálisan transzgenikus törzset hoztam létre, melyből 3 valóban tartalmazza a transzgént. Erről PCR segítségével bizonyosodtam meg, amelyhez olyan primereket alkalmaztam, melyek kizárólag a transzgénnel rendelkező törzsekből izolált DNS esetében eredményezhetnek terméket. A hatékony mutáns *screen*-hez fontos, hogy az állatok stabilan fejezzék ki a transzgént, ezért megvizsgáltam, hogy az említett 3 igazoltan transzgenikus törzsből van-e olyan, amely nem extrakromoszómálisan, hanem egy kromoszómába integráltan hordozza a transzgént. Ezek a vizsgálatok jelenleg is folynak, de úgy tűnik, hogy az eddig izolált törzsek csupán extrakromoszómális elemek hordozzák a transzgént. Az egyik törzs esetében megvizsgáltam, hogy milyen hatással van az állatokra a hősokk, amihez felnőtt hermafroditákat hősokkoltam, majd 5 órát követően preparáltam az embriókat “bleaching” módszerrel. A kezeletlen és hősokkolt vad illetve transzgenikus embriókat fénymikroszkóppal fotózva azt tapasztaltam, hogy a hősokkolt *phsp-16::egl-1* embriók egy jelentős része feltehetően az ektopikusan indukált apoptózisnak köszönhetően rendellenes morfológiájú és elpusztul [10.

Ábra], ami arra utal, hogy a transzgén a vártan megfelelően működik ebben a törzsben, melyet végül qPCR-rel is igazoltam [11. Ábra].



10. Ábra: Vad típusú (N2) és transzgenikus *phsp-16::egl-1* peték megjelenése fénymikroszkóppal vizsgálva: A hősokkolt transzgenikus peték között többen rendellenes morfológia lépett fel feltehetően a megnövekedett sejthalározás miatt, mely kisebb mértékben, vélhetően szívargás miatt, a transzgenikus kontrollban is feltűnt. K=kontroll, HS=hősokkolt. A képek Zeiss AxioImager Z1 epifluoreszcens mikroszkóppal készült 14X-es objektívvel.



11. Ábra: *egl-1* mRNS szint változása N2 és *phsp-16.2::egl-1* esetében, az N2 kontrollhoz viszonyítva: A qPCR méréseket mintánként 3 technikai párhuzamossal végeztem el. K=kontroll, HS=hősokkolt.

Diszkusszió

Eredményeink alapján kétségtelen, hogy az eddigi leírásokkal szembemenve (2) a *hsf-1(sy441)* mutánsban kódolt C-terminálisan csonkolt fehérje bizonyos mértékben képes célgénjeinek transzkripcióját aktiválni, ráadásul egyes esetekben még erőteljesebben, mint a vad típusú HSF-1. A HSF-1 által végzett transzkripció aktiváció pontos mechanizmusa fonálférgekben nem ismert (erre rávilágítást az EMS mutagenézissel izolált új allélek segítségével remélünk), ám a jelek immár bizonyosan arra felé mutatnak, hogy érdemes erre felé kutatni. A lehetséges magyarázat, hogy a TTV450 *hsf-1(sy441x4)* és a PS 1740 *hsf-1(sy441)* törzsek között tapasztalt különbség mögött egy háttérmutáció állhat. Fontos lehet a hősokk mikéntje (például a hőmérséklet és az idő), melyek befolyásolhatják a mutáns fehérje transzkripciós aktivitását. Néhány tanulmányban a hősokkot követően közvetlenül történt az RNS-ek izolálása (2, 10). Elképzelhető, hogy az *sy441* mutáció termoszenzitív és a hősokkot követően 20°C-on eltöltött idő elégséges arra, hogy a fehérje visszanyerje eredeti térszerkezetét és aktiválja célgénjeinek transzkripcióját, mely ugyan nem valószínű, hiszen az *sy441* nonszensz mutációt tartalmaz, de érdemes lenne megvizsgálni ezt a lehetőséget is a későbbiekben. Felvetődik annak a lehetősége is, hogy aktív HSF-1 hiányában valamilyen más stresszmechanizmus kompenzál ilyenkor, illetve ahol a válasz még erősebb, mint a vad típusnál, akár túlkompenzál, ám RNS-interferenciás kísérletünk eredménye nem erre utal.

Érdekes jelenség, hogy *phsp-16.2::gfp* riportterrel végzett kísérleteink alapján a *hsf-1(sy441)* mutáns állatokban a kontrollhoz képest megkésve és kisebb intenzitással megjelenő GFP expressziója szinte kizárólag a belsejtekben válik egyértelművé. Az expresszió szövetspecifikusságát érdemes lenne a későbbiekben más hősokk-promóter által szabályozott riportterek vizsgálatával is alátámasztani, mindemellett viszont ismert, hogy a *hsf-1* élethosszal összefüggő funkciói az ideg- és belsejtekkel állhatnak összefüggésben (16).

Annak a vizsgálata, hogy a *hsf-1(sy441)* által kódolt HSF-1 képes-e a hősokk gének transzkripciójának aktiválására azért is bír kiemelkedő jelentőséggel, mert elképzelésünk szerint az a tény, hogy a *hsf-1(ok600)* nullmutáns lárva letális, míg az *sy441* életképes (10), valamint az, hogy a C-terminálisan trunkált HSF-1 fehérje túltermelése megnöveli az állatok hőstressztűrő képességét (9), arra utal, hogy a HSF-1 valamilyen más mechanizmussal, esetleg más fehérjékkel interaktálva képes fontos feladatot ellátni az egyedfejlődésben és a stresszre adott válasz során.

Dolgozatom második részében beszámoltam azon erőfeszítéseinkről, hogy egy olyan transzgenikus törzset hozzunk létre, amely lehetővé tenni egy szelekciós mutáns *screen* végrehajtását annak érdekében, hogy új, transzkripció aktiválásra nem képes, de életképes *hsf-1* mutáns törzseket izoláljunk. Az első *phsp-16::egl-1* transzgenikus törzsek létrehozása megtörtént és jellemzésük megkezdődött, s az egyik törzs esetében eredményeink arra utalnak, hogy bennük hősök hatására apoptózis indukálódik. Ez biztató ugyan, de nem zárható ki, hogy csupán az embriók izolálásához használt hipokloritos *bleach* oldat a különböző vad és transzgenikus törzsekre nézve eltérő hatását tapasztaltuk, ezért ez irányban további vizsgálatokra van szükség. Fontos lenne a *phsp16::egl-1* törzsek esetében egy hősöket követő túlélési esszé végrehajtása, amivel egyértelműen tesztelhető lenne a törzs alkalmassága a szelekciós mutáns *screen*-hez, ugyanis a dolgozatomban leírt eredmények még inkább időszűrővé teszik, hogy új *hsf-1* mutáns törzseket izoláljunk, melyek vizsgálatával számos jelenleg még nyitott kérdés megválaszolásához juthatnánk közelebb.

Szerzői Hozzájárulás

Az RNS szekvenálás adatainak ellenőrzésében részt vettem, a cDNS mintákból PCR segítségével amplifikáltam az *sy441* pontmutációt tartalmazó szakaszt, és azt szekvenálásra előkészítettem.

Az N2, *hsf-1(sy441)* és PS1740 *hsf-1(sy441)* törzseket, melyeket megkaptam, a kutatás ideje alatt fenntartottam, belőlük teljes RNS-populációt izoláltam, melyből cDNS-t írtam és abból RT qPCR-t állítottam össze. A mérések eredményét értékeltem és ellenőriztem.

A már rendelkezésre álló *phsp-16.2::gfp* és *hsf-1(sy441); hsp-16.2::gfp* törzseket fenntartottam, szinkronizáltam, hősökkoltam és fluoreszcens mikroszkópiára előkészítettem.

Genomi DNS-ből kiindulva a *pPD49.78 phsp-16:egl-1* konstrukciót létrehoztam és ezt felhasználva bioliztikus transzformációval transzgenikus törzset hoztam létre. A transzgenikus törzseket hősökkoltam, embrió preparátumot hoztam létre belőlük, előkészítettem a mintákat a mikroszkópos vizsgálatokra, valamint RNS-t izolálva és abból cDNS-t írva RT qPCR-t végeztem, a mérést értékeltem és ellenőriztem.

Függelék

1. Táblázat.

	Vad Kontroll				Vad HS				TTV 450 <i>hsf-1</i> (sy441) K				TTV 450 <i>hsf-1</i> (sy441) HS			
	CQ _{átl}	CQ ₁	CQ ₂	CQ ₃	CQ _{átl}	CQ ₁	CQ ₂	CQ ₃	CQ _{átl}	CQ ₁	CQ ₂	CQ ₃	CQ _{átl}	CQ ₁	CQ ₂	CQ ₃
<i>hsp-70A</i>	30,66	30,45	30,83	30,71	24,23	23,38	25,44	23,86	31,9	31,29	31,98	32,44	26,79	26,42	27,34	26,61
<i>hsp-70B</i>	23,85	23,74	23,9	23,91	19,93	20,16	19,61	20,02	24,53	24,49	24,5	24,59	19,8	19,9	19,59	19,92
<i>hsp-16.2</i>	27,42	27,51	27,37	27,37	20,49	21,85	19,49	20,12	30,37	29,78	-	30,96	23,93	23,99	23,83	23,98
<i>hsp-16.11</i>	22,86	22,95	22,91	22,71	17,41	17,73	17,08	-	22,9	22,74	22,99	22,97	20,09	20,47	-	19,71
<i>cdc-42</i>	21	-	20,78	21,21	20,47	20,8	20,13	-	21,7	-	21,7	-	22,64	22,85	21,78	23,3

2. Táblázat.

		Vad Kontroll	Vad HS	TTV 450 <i>hsf-1</i> (sy441) K	TTV 450 <i>hsf-1</i> (sy441) HS	PS1740 <i>hsf-1</i> (sy441) K	PS1740 <i>hsf-1</i> (sy441) HS
<i>hsp-70A</i>	CQ _{átl}	29,56	20,53	27,61	23,3	30,51	26,68
	CQ ₁	-	20,38	27,54	23,69	30,13	27,14
	CQ ₂	29,95	-	27,34	22,84	29,94	26,48
	CQ ₃	29,16	20,67	27,94	23,37	31,46	26,42
<i>hsp-70B</i>	CQ _{átl}	21,72	19,77	23,12	19,06	23,92	19,67
	CQ ₁	21,73	19,62	23,08	18,96	23,81	19,72
	CQ ₂	21,75	19,87	23,15	18,91	24,13	19,62
	CQ ₃	21,69	19,82	23,14	19,31	23,81	19,67
<i>hsp-16.2</i>	CQ _{átl}	29,47	18,63	25,9	20,45	29,64	24,25
	CQ ₁	29,66	19,34	25,82	20,2	29,77	24,22
	CQ ₂	29,58	18,31	25,83	20,37	29,38	24,24
	CQ ₃	29,18	18,24	26,06	20,79	29,76	24,28
<i>hsp-16.11</i>	CQ _{átl}	22,22	15,87	22,09	17,49	25,88	19,09
	CQ ₁	22,24	15,84	22,11	17,41	29,5	19,04
	CQ ₂	22,15	16,16	22,1	17,72	24,19	19,08
	CQ ₃	22,28	15,6	22,06	17,33	23,95	19,14
<i>cdc-42</i>	CQ _{átl}	18,52	19,38	19,71	19,57	22,35	20,39
	CQ ₁	18,32	19,07	19,68	19,66	22,41	20,35
	CQ ₂	-	19,68	19,69	19,13	22,47	20,52
	CQ ₃	18,72	-	19,75	19,93	22,16	20,31

Irodalomjegyzék

1. Gomez-Pastor R, Burchfiel ET, Thiele DJ. Regulation of heat shock transcription factors and their roles in physiology and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2018 Jan;19(1):4–19.
2. Hajdu-Cronin YM, Chen WJ, Sternberg PW. 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.* 2004 Dec;168(4):1937–49.
3. Verma P, Pfister JA, Mallick S, D’Mello SR. HSF1 protects neurons through a novel trimerization- and HSP-independent mechanism. *J Neurosci.* 2014 Jan 29;34(5):1599–612.
4. Dai C, Whitesell L, Rogers AB, Lindquist S. Heat shock factor 1 is a powerful multifaceted modifier of carcinogenesis. Elsevier.
5. Santagata S, Hu R, Lin NU, Mendillo ML, Collins LC, Hankinson SE, et al. High levels of nuclear heat-shock factor 1 (HSF1) are associated with poor prognosis in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011 Nov 8;108(45):18378–83.
6. Li J, Labbadia J, Morimoto RI. Rethinking HSF1 in stress, development, and organismal health. *Trends Cell Biol.* 2017 Dec;27(12):895–905.
7. Akerfelt M, Morimoto RI, Sistonen L. Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010 Aug;11(8):545–55.
8. Barna J, Csermely P, Vellai T. Roles of heat shock factor 1 beyond the heat shock response. *Cell Mol Life Sci.* 2018 Aug;75(16):2897–916.
9. Baird NA, Douglas PM, Simic MS, Grant AR, Moresco JJ, Wolff SC, Yates JR 3rd, Manning G, Dillin A. HSF-1-mediated cytoskeletal integrity determines thermotolerance and life span. *Science.* 2014 Oct 17;346(6207):360-3. doi: 10.1126/science.1253168. PMID: 25324391; PMCID: PMC4403873.
10. Morton EA, Lamitina T. *Caenorhabditis elegans* HSF-1 is an essential nuclear protein that forms stress granule-like structures following heat shock. *Aging Cell.* 2013 Feb;12(1):112–20.
11. Jedlicka P, Mortin MA, Wu C. Multiple functions of *Drosophila* heat shock transcription factor in vivo. *EMBO J.* 1997 May 1;16(9):2452-62. doi: 10.1093/emboj/16.9.2452. PMID: 9171358; PMCID: PMC1169845.
12. Breckenridge DG, Kang BH, Kokel D, Mitani S, Staehelin LA, Xue D. *Caenorhabditis elegans* drp-1 and fis-2 regulate distinct cell-death execution pathways downstream of ced-3 and

independent of ced-9. Mol Cell. 2008 Aug 22;31(4):586-597. doi: 10.1016/j.molcel.2008.07.015. PMID: 18722182; PMCID: PMC2548325.

13. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res. 2001 May 1;29(9):e45. doi: 10.1093/nar/29.9.e45. PMID: 11328886; PMCID: PMC55695.

14. Barna J, Princz A, Kosztelnik M, Hargitai B, Takács-Vellai K, Vellai T. Heat shock factor-1 intertwines insulin/IGF-1, TGF- β and cGMP signaling to control development and aging. BMC Dev Biol. 2012 Nov 1;12:32. doi: 10.1186/1471-213X-12-32. PMID: 23116063; PMCID: PMC3558376.

15. SnapGene software (www.snapgene.com)

16. Morphis AC, Edwards SL, Erdenebat P, Kumar L, Li J. Auxin-Inducible Degron System Reveals Temporal-Spatial Roles of HSF-1 and Its Transcriptional Program in Lifespan Assurance. Front Aging. 2022 Jul 11;3:899744. doi: 10.3389/fragi.2022.899744. Erratum in: Front Aging. 2022 Sep 12;3:1006781. PMID: 35899092; PMCID: PMC9309338.

Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani a témavezetőmnek, Barna Jánosnak, a rengeteg és töretlen támogatásért, amit nyújtott. Köszönet illeti Vellai Tibort, tanszékünk vezetőjét, mert lehetővé tette, hogy itt végezhessem munkám, továbbá szeretném kifejezni hálámat Kovács Dánielnek, Saqib Ahmed-nek, Kiss Dórinak és Bucska Tamarának segítségükért és útmutatásukért.