Az SKN-1/NRF2 antioxidáns transzkripciós faktor szerepének vizsgálata az immunválaszban

Doktori értekezés

Papp Diána

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola

Témavezető: Dr. Sőti Csaba, egyetemi adjunktus, Ph.D.

Hivatalos bírálók: Dr. Andó István tudományos tanácsadó, Ph.D.
Dr. Igaz Péter egyetemi adjunktus, Ph.D.

Szigorlati bizottság
elnöke: Dr. Ligeti Erzsébet egyetemi tanár, az MTA tagja
tagjai: Dr. Vellai-Takács Krisztina egyetemi adjunktus, Ph.D.
Dr. Mócsai Attila, egyetemi docens, Ph.D.

Budapest
2013

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK 2
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE 4
1. BEVEZETÉS 5
1.1. Általános bevezető 5
1.2. Irodalmi háttér 6
1.2.1. Az NRF2 bemutatása *6*
1.2.1.1. Az NRF2 szerkezete és szabályozása *6*
1.2.1.2. Az NRF2 szerepe patológiás folyamatokban *10*
1.2.2. Az SKN-1, az NRF2 Caenorhabitis elegans ortológjának bemutatása *12*
1.2.2.1. A Caenorhabitis elegans fonálféreg, mint modellállat *13*
1.2.2.2. Az SKN-1 szerkezete és élettani jelentősége C. elegans fonálféregben *14*
1.2.3. A C. elegans immunválaszának és immunszeneszcenciájának jellemzése *17*
1.2.3.1. A C. elegans immunválasza *17*
1.2.3.3. Az immunszeneszcencia emberben és C. elegans-ban *25*
2. CÉLKITŰZÉSEK 29
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK 30
3.1. Az NRF2 bioinformatikai elemzéséhez felhasznált módszerek 30
3.1.1. Az NRF2 interakciós adatbázisának kiépítése *30*
3.1.2. NRF2 funkcióinak feltérképezése *31*
3.2. Az SKN-1 vizsgálatához felhasznált anyagok és módszerek 31
3.2.1. Caenorhabditis elegans törzsek *31*
3.2.2. Baktérium törzsek *32*
3.2.3. C. elegans fonálférgek fenntartása *32*
3.2.4. C. elegans fonálférgek keresztezése *33*
3.2.5. Géncsendesítés „etetéses” RNS interferenciával C. elegans-ban *35*
3.2.6. A patogén baktérium lemezek előkészítése patogén túlélési teszthez *35*
3.2.7. Patogén túlélési teszt *36*
3.2.8. Az SKN-1 célgének aktiválásának vizsgálata fluoreszcens mikroszkópiával *37*
3.2.9. Az SKN-1 lokalizációjának vizsgálata fluoreszcens mikroszkópiával *37*
3.2.10. Patogén túlélési teszt oxidatív előkezeléssel *38*
3.2.11. C. elegans fonálférgek oxidatív toleranciájának mérése *39*
3.2.13. Az öregedés-függő SKN-1 célgének jellemzése *39*

3.2.14. Statisztikai elemzés *39*

4. EREDMÉNYEK 41

4. 1. Az NRF2 funkcióinak vizsgálata bioinformatikai eszközökkel 41

4.1.1. NRF2 interakciós adatbázis *41*

4.1.2. NRF2 funkciók predikciója interakciós partnerek funkcióinak elemzésével *43*

4.2. Az SKN-1 *C. elegans* immunitásában betöltött szerepének vizsgálata 45

4.2.1. Az SKN-1 szükséges a megfelelő immunválasz kialakításához C. elegans-ban *45*

4.2.2. SKN-1 aktiváció vizsgálata Pseudomonas aeruginosa fertőzés során *46*

4.2.2.1. Az SKN-1 a sejtmagba transzlokálódik P. aeruginosa fertőzés hatására *46*

4.2.2.2. Az SKN-1 aktiválja célgénjei expresszióját P. aeruginosa fertőzés hatására *48*

4.2.3. A P. aeruginosa-indukálta SKN-1 aktiváció szabályozásának vizsgálata *50*

4.2.3.1. A PMK-1 részt vesz az SKN-1 aktivációjában P. aeruginosa fertőzés során *50*

4.2.3.2. A TIR-1 szükséges az SKN-1 aktivációjához P. aeruginosa fertőzés során *50*

4.2.4. Az SKN-1 szerepének vizsgálata a C. elegans immunszeneszcenciájában *53*

4.2.4.1. Öregedés során csökken a P. aeruginosa fertőzés indukálta SKN-1 aktiváció *53*

4.2.4.2. Az SKN-1 által szabályozott öregedés-függő gének jellemzése *55*

4.2.4.3. Öregedés hatása a P. aeruginosa bakteriális fertőzéssel szembeni ellenállóképességre *56*

4.2.5. SKN-1 szükséges a csökkent inzulin/IGF jelátvitel okozta fokozott immunitáshoz *58*

4.2.6. Oxidatív előkezelés megnöveli a C. elegans patogén rezisztenciáját és hatásához az SKN-1-et igényli *59*

4.2.7. Az SKN-1 hiperaktiváció csökkenti a C. elegans patogén rezisztenciáját *61*

5. MEGBESZÉLÉS 64

5. 1. Az NRF2 interakciós adatbázisból származó eredmények megbeszélése 64

5.2. Az SKN-1 *C. elegans* immunitásában betöltött szerepét bemutató eredmények megbeszélése 68

6. KÖVETKEZTETÉSEK 75

7. ÖSSZEFOGLALÁS 78

8. SUMMARY 79

9. IRODALOMJEGYZÉK 80

10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE 98

11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS 99

12. MELLÉKLET 100

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ARE: antioxidáns válasz elem

BHI: *Brain Heart Infusion* tápfolyadék baktériumok számára

bZIP: bázikus leucin cipzár domén

Cnc: Cap ’n Collar transzkripciós faktorok családja

COPD: krónikus obstruktív tüdőbetegség

DAF-16: FOXO transzkripciós faktor *C. elegans* ortológja

DAF-2: inzulin/IGF receptor

EV: üres vektort tartalmazó HT115(DE3) baktérium, az RNSi kísérletek kontrollja

FUdR: 5-fluoro-2′-deoxiuridin

GCS-1: γ-glutamil-cisztein szintetáz

GO: *Gene Ontology*

GSK-3: glikogén szintáz kináz 3

GST: glutation-S-transzferáz

IGF: inzulinszerű növekedési faktor

IIS: inzulin/IGF jelátviteli útvonal

IPTG: izopropil β-D-1-tiogalaktopiranozid

KEAP1: kelch-szerű ECH-asszociált fehérje

L1-L4: a *C. elegans* egymást követő lárvastádiumai

LB: Luria-Bertani tápoldat baktériumok számára

Neh: Nrf2-ECH homológ domén

NGM: *Nematode Growth Medium*, a *C. elegans* fenntartására alkalmas táptalaj

NLS: nukleáris lokalizációs szignál

PAMP: patogén-asszociált molekuláris mintázat

PCR: polimeráz láncreakció

PI3K: foszfoinozitol-3 kináz

RNSi: RNS interferencia

ROS: reaktív oxigén gyökök

SKN-1: SKiNhead transzkripciós faktor, az NRF2 *C. elegans* ortológja

TIR-1: Toll/interleukin-1 rezisztencia domén fehérje

Ub: ubikvitin

WDR-23: WD40 ismétlődést tartalmazó fehérje

1. BEVEZETÉS

1.1. Általános bevezető

A változó környezethez, stresszhez történő adaptáció nélkülözhetetlen az élőlények túléléséhez. Doktori munkám középpontjában az oxidatív és xenobiotikus stresszválasz egyik mesterregulátora, az SKN-1/NRF2 transzkripciós faktor áll. Szervezetünk sejtjeiben az életfolyamataik során folyamatosan termelődnek toxikus metabolitok, köztük reaktív oxigén gyökök (ROS), amelyek károsítják valamennyi sejtalkotó makromolekulát. Az NRF2 transzkripciós faktor számos antioxidáns és a sejt méregtelenítő folyamataiban résztvevő enzim expresszióját képes aktiválni, amelyek csökkentik az oxidatív stressz és az általa okozott károsodás mértékét. A sejteket az oxidatív stressz extracelluláris forrásból is érheti, pl. oxidáló vegyszerek, bakteriális toxinok, egyes immunsejtjeink pedig reaktív oxigén gyökökkel (ROS) pusztítják el a kórokozó baktériumokat.

Fokozott oxidatív stressz tapasztalható öregedéskor, valamint több patológiás folyamat alkalmával is, pl. érelmeszesedésben, Alzheimer kórban, krónikus obstruktív tüdőbetegségben. Ismert az NRF2 jótékony hatása ezen betegségek megelőzésében, illetve a szöveti károsodás mértékének csökkentésében. Ily módon az NRF2 új gyógyszercélponttá vált. Az NRF2 immunitásban játszott szerepe azonban tisztázatlan, így annak feltárása hozzájárulhat a betegségek hatékonyabb kezelésének kialakításához. Habár az NRF2 intenzíven kutatott fehérje, nincsen átfogó adatbázis kölcsönható partnereiről, amelyek összegyűjtése és elemzése elősegítheti az NRF2 szabályozásának megértését és a célzott, hatékony gyógyszertervezést.

1.2. Irodalmi háttér

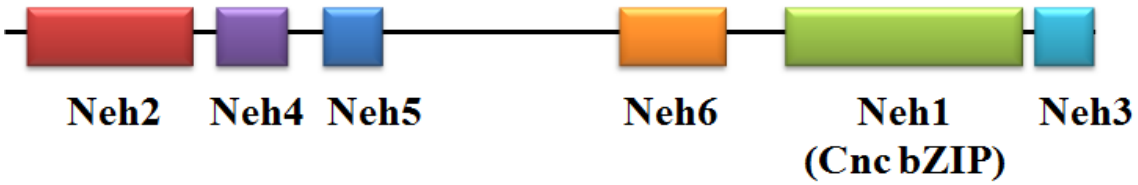
1.2.1. Az NRF2 bemutatása

1.2.1.1. Az NRF2 szerkezete és szabályozása

Az NRF2 a konzervált bázikus leucin zipzár (bZIP) transzkripciós faktorokat magába foglaló *Cap 'n collar* (Cnc) fehérjék családjába tartozik. Nevüket a DNS-kötő doméntől N-terminálisan elhelyezkedő 43 aminosavból álló Cnc-doménről kapták (Sykiotis és Bohmann, 2010). A Cnc fehérje-család tagjai jelen vannak a többsejtű állatokban, pl.: *Caenorhabditis elegans* fonálféregben SKN-1 (Walker és mtsai, 2000), *Drosophila melanogaster* gyümölcslégyben Cnc (Mohler és mtsai, 1991), emlősökben: p45 NFE2, NRF1, NRF2 és NRF3; míg növényekben és gombákban nem fordulnak elő (Sykiotis és mtsai, 2010). A Cnc transzkripciós faktorok részt vesznek az egyedfejlődésben és/vagy hozzájárulnak a sejtek homeosztázisának fenntartásához különböző stresszhatások során. A két élettani folyamatban résztvevő fehérjét egyetlen gén kódolja *C. elegans*-ban és *D. melanogaster*-ben, míg gerincesekben a különböző funkciókhoz más gének társíthatók (Sykiotis és mtsai, 2010).

Emlősökben mindhárom NRF fehérje részt vesz az oxidatív stresszválaszban, azonban eltérő élettani szereppel rendelkeznek, amelyet a génkiütött egérmodellek különböző fenotípusai bizonyítanak. Az Nrf1 elsősorban az egyedfejlődésben vesz részt: az *nrf1-/-* egerek a máj eritropoézis zavara miatt embrionális korban elpusztulnak (Chan és mtsai, 1998). Az Nrf2 jelentősége összetettebbnek tűnik: szerepe van a sejtek redox homeosztázisának megőrzésében, a detoxifikációban valamint az immunmodulációban (gyulladáscsökkentő hatás). Az *nrf2-/-* állatok fokozottan érzékenyek a stresszhatásokkal szemben, és idős korban neurodegeneratív betegség valamint a humán szisztémás lupus erythematosus-hoz hasonló autoimmun betegség figyelhető meg bennük (Ma és mtsai, 2006; Yoh és mtsai, 2001). A három NRF fehérje átfedő szöveti expressziós mintázattal rendelkezik, így a génkiütött egerek fenotípusaiban tapasztalható különbség feltehetően a három fehérje eltérő szabályozásának, sejten belüli elhelyezkedésének és transzkripció-aktiváló képességének köszönhető. Míg az NRF2 legfontosabb regulátora a KEAP1, az NRF1 és az NRF3 nem áll a KEAP1 szabályozása alatt (Sykiotis és mtsai, 2010; Zhang és mtsai,

2006). Az NRF2 stresszmentes állapotban a citoplazmában és részben a mitokondriumban helyezkedik el, ugyanakkor az NRF1 és NRF3 integráns membránfehérjeként az endoplazmás retikulum membránjában találhatók (Nouhi és mtsai, 2007; Zhang és mtsai, 2006). Az NRF2 hatékonyabban képes célgénjeinek transzkripcióját aktiválni, mint az NRF1 vagy az NRF3. Ez lehetséges, hogy az utóbbiak membrán-lokalizáltságának valamint annak köszönhető, hogy az NRF2 két transzaktivátor doménnel rendelkezik (Sykiotis és mtsai, 2010).



1. ábra Az NRF2 doménszerkezete

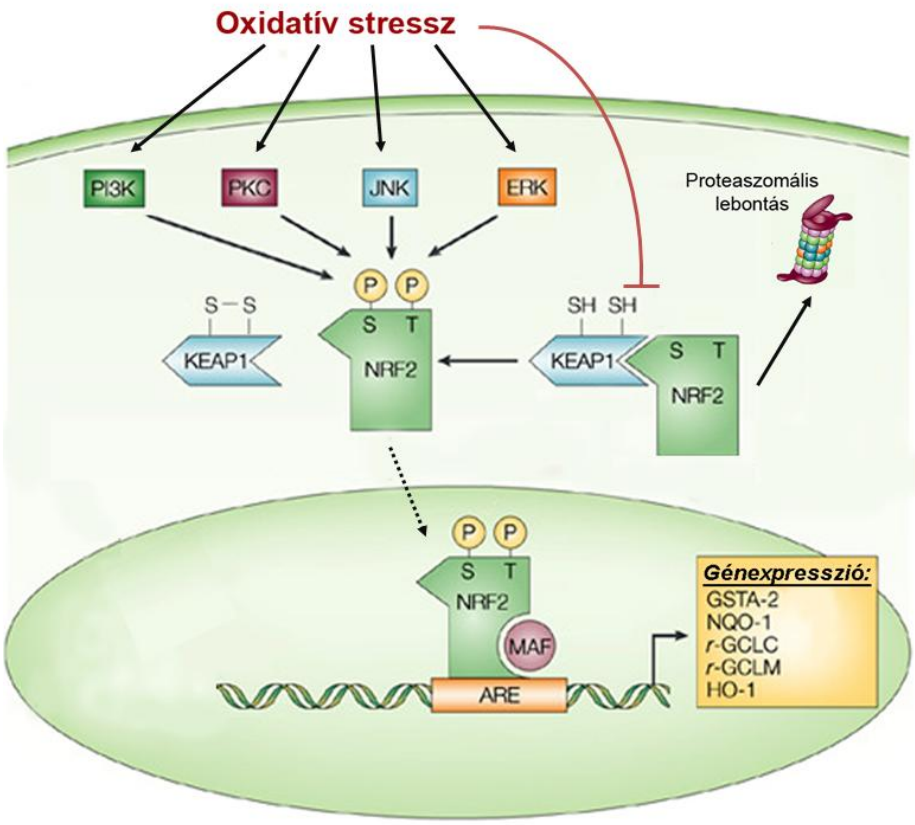
Az NRF2 első doménje az N-terminálison a Neh2, amelyhez stresszmentes körülmények között a KEAP1 kötődik. A Neh4/5 és Neh3 további fehérje interakciós domének, amelyekhez az NRF2 transzaktivációját szabályozó fehérjék kapcsolódnak. A Neh6 a fehérje „*turnover*”-ében vesz részt. A Neh1 domén tartalmazza a bázikus leucin cipzár (bZIP) elemet a Cnc (*Cap ’n collar)* doménben. A Neh1 domén szerepet játszik a dimerképzésben, amely feltétele az NRF2 DNS-kötésének. Az ábra Kobayashi és Yamamoto összefoglaló munkája alapján készült (Kobayashi és Yamamoto, 2005).

Az NRF2 hat Neh (Nrf2-ECH homológ) doménből épül fel, amelyek funkcióit Kobayashi és Yamamoto összefoglaló cikke részletesen bemutatja (**1. ábra**) (Kobayashi és mtsai, 2005). A Neh1 domén tartalmazza a bZIP régiót, amelyen keresztül a transzkripciós faktor heterodimerizációja és DNS kötése valósul meg (Itoh és mtsai, 1997). Az NRF2 csak heterodimer formában képes a DNS-hez kötődni. Leggyakoribb partnerei a kis Maf fehérjék, de más transzkripciós faktorokkal is képezhet dimert, pl.: ATF4, c-Jun (He és mtsai, 2001; Venugopal és Jaiswal, 1998). A Neh4 és Neh5 domének platformul szolgálnak további fehérje interakciók számára: ezen két doménhez kapcsolódik az NRF2 transzkripció-aktiváló (transzaktiváló) hatását fokozó CBP (CREB kötő fehérje) illetve gátló SMRT (sejtmag receptor korepresszor-2) (Katoh és mtsai, 2001; Ki és mtsai, 2005). A Neh3 domén feltételezhetően szintén részt vesz a transzaktivációban (Nioi és mtsai, 2005), míg a Neh6 domén a fehérje „*turnover*”-ében

jelentős (Rada és mtsai, 2011). A két utóbbi doménről sajnos kevés információ áll a rendelkezésünkre, ezek funkcióinak részletesebb feltárása hozzájárulhat az NRF2 szabályozásának megértéséhez.

Az NRF2 Neh2 doménjéhez stresszmentes körülmények között a KEAP1, az NRF2 elsődleges regulátora kapcsolódik (Itoh és mtsai, 1999) (**1.** és **2. ábra**). A KEAP1 több reaktív cisztein aminosavat tartalmaz, amelyek közül kettő (Cys273, Cys288) oxidálószer jelenlétében diszulfid-hidat képez, így a KEAP1 oxidatív szenzorként funkcionál (Itoh és mtsai, 1999). Stresszmentes körülmények között a KEAP1 két módon is gátolja az NRF2 aktivációját. Aktinhoz kapcsolódva a KEAP1 kipányvázza az NRF2-t a sejtvázhoz és megakadályozza annak sejtmagba vándorlását (Strachan és mtsai, 2004). Emellett a KEAP1 elősegíti az NRF2 (Neh2 domén) poli-ubikvitinálódását és proteaszomális lebontását (Kobayashi és mtsai, 2004). Oxidálószer hatására megváltozik a KEAP1 térszerkezete a két kritikus cisztein által képzett diszulfid-híd miatt, aminek következtében elengedi az NRF2-t. Az NRF2 maga is oxidálódik és konformációváltozáson megy át, amelynek eredménye a sejtmagi lokalizációs jel (NLS) felszínre kerülése és a fehérje sejtmagi transzportja. Az NRF2 sejtmagi export jelet is hordoz, amely az oxidálódott tiol-csoportok regenerációja során újból felszínre kerül. Ekkor az NRF2 citoplazmába exportálódik, ahol újra kapcsolódik a redukált KEAP1 fehérjével (Theodore és mtsai, 2008).

Az NRF2 több foszforilációs helyet tartalmaz, amelyek foszforilációja befolyásolja az NRF2 aktivációját (**2. ábra**). A Neh2 doménben ilyen pozíció pl. a Ser40, amelyet a PKC (protein kináz C) foszforilál, elősegítve az NRF2 disszociációját a KEAP1-től (Huang 2002). Izotiocianát kezelés hatására a sejtnövekedésben és differenciációban résztvevő ERK2 (extracelluláris jel által szabályozott kináz 2) és a stressz szignált közvetítő JNK1 (c-Jun N-terminális kináz 1) foszforilálja az NRF2-t, elősegítve annak sejtmagi transzlokációját (Xu és mtsai, 2006). Salazar és mtsai bemutatták, hogy a túlélési jelet közvetítő PI3K/AKT foszforilációja elősegíti, míg a GSK3β (glikogén-szintáz kináz) gátolja az NRF2 sejtmagi akkumulációját (Salazar és mtsai, 2006). Sőt, kimutatták, hogy a GSK3β fontos szerepet játszik az antioxidáns stresszválasz terminálásában. A GSK3β Src kinázokat aktivál (Fyn, Src, Yes, és Fgr), amelyek az NRF2 Tyr568-at foszforilálva fokozzák annak nukleáris exportját és proteaszomális lebontását (Niture és mtsai, 2011).



2. ábra Az NRF2 aktiválása oxidatív stressz során

Az NRF2 nyugalmi állapotban a KEAP1-hez kapcsolódik, amely gátolja sejtmagi transzportját és elősegíti proteaszomális lebontását. Oxidatív stressz során a KEAP1 kritikus ciszteinjei diszulfid-hidat képeznek és az NRF2 felszabadul a gátlás alól. Az oxidatív stressz kinázokat (PI3K, PKC, JNK, ERK) aktivál, amelyek foszforilálják az NRF2-t elősegítve stabilizációját és sejtmagi transzportját. Az NRF2 sejtmagba jutva kis Maf fehérjékkel dimerizál, kapcsolódik a célgénjeinek promóterében levő ARE szekvenciához (antioxidáns válasz elem), majd indukálja azok expresszióját. Célgénjei között szerepelnek antioxidáns enzimek és 2. fázisú biotranszformációs enzimek (GSTA-2, NQO-1, GCLC, GCLM, HO-1), amelyek csökkentik az oxidatív stressz és az általa okozott károsodás mértékét. Az ábra (Surh, 2003) alapján készült.

Oxidatív stressz hatására az NRF2 a sejtmagba vándorol és pl. kis Maf fehérjékkel heterodimert képez (**2. ábra**). A dimer az NRF2 célgénjeinek promóterében levő ún. ARE (antioxidáns válasz elem) DNS szekvenciához kötődik és indukálja az antioxidáns enzimek, pl. Prx1 (peroxiredoxin 1) illetve nem enzimatikus antioxidánsok, pl. glutation szintézisében fontos enzimek, pl. GCL (glutaminsav-cisztein ligáz)

expresszióját (Kim és mtsai, 2007; Lee és mtsai, 2005). Az NRF2 emellett a xenobiotikumok detoxifikálásában részt vevő 2. fázisú biotranszformációs enzimek transzkripcióját is indukálja, pl. HO-1 (hem oxigenáz-1), GST (glutation-S transzferáz), NQO1 (NADPH-kinon oxidoreduktáz 1) (Dhakshinamoorthy és Porter, 2004; Ogborne és mtsai, 2005; Sibhatu és mtsai, 2008). Megjegyzendő, hogy a glutation központi szerepet tölt be mindkét folyamatban, így több NRF2 célgén mindkét fenti kategóriába besorolható. Az NRF2 célgénjei tehát közvetlenül vagy közvetetten részt vesznek az oxidatív stressz során károsodott fehérjék regenerálásában (tiol-csoportok), illetve a stresszforrás csökkentésében (pl. reaktív oxigén gyökök).

1.2.1.2. Az NRF2 szerepe patológiás folyamatokban

Az NRF2 célgénjei révén elősegíti a sejtek túlélését az oxidatív stresszel járó patológiás folyamatok során. Ily módon azonban hatása ellentmondó lehet a szervezet számára. Az NRF2 pozitív hatású a gyulladás-indukálta szövetkárosodás csökkentésekor, azonban aktivitása káros a tumorsejtek extrém környezethez történő adaptációjakor. Az NRF2 több, elsősorban gyulladással együtt járó betegségben érintett, amelyeket az **1. táblázat**ban foglaltam össze. Az NRF2 szerepét részletesen három, a társadalom széles rétegét érintő betegségben mutatom be: krónikus obstruktív tüdőbetegségben, neurodegeneratív illetve tumoros betegségek esetén.

A tüdő gyulladásos megbetegedéseivel szemben az *nrf2-/-* egerek rendkívül érzékenyek, ezek közül az egyik legelterjedtebb a krónikus obstruktív tüdőbetegség (COPD) (Kensler és mtsai, 2007). A COPD 2011-ben a 4. leggyakoribb halálok volt a világon a WHO felmérése szerint, amelynek előrejelzése szerint 2020-ban már a 3. helyen szerepelhet (Comandini és mtsai, 2010). A COPD hátterében elsősorban a tüdő dohányfüst általi oxidatív terhelése áll, amely folyamatosan stimulálja a gyulladásban résztvevő immunsejteket (makrofágok, neutrofil granulociták), amelyek súlyos szöveti károsodást okoznak (Church és Pryor, 1985; Rahman és MacNee, 1996). Az *nrf2-/-* egerekben cigarettafüst hatására korábban alakul ki tüdőtágulás mint a vad típusú egerekben, amely erőteljes légúti gyulladással és az alveoláris sejtek apoptózisával jár (Rangasamy és mtsai, 2004). A tüdőben több mint 50 NRF2-függő antioxidáns és

sejtvédő gént azonosítottak, amelyek indukálása csökkentheti a tüdőben az oxidatív stresszt és a gyulladást. Így az elmúlt évtizedben az NRF2 új célpontjává vált a COPD elleni gyógyszer-tervezésnek (Kensler és mtsai, 2007).

1. táblázat Az NRF2 szerepe patológiás folyamatokban

Betegség típus	Betegség	NRF2 hatása	Referencia
Légúti megbetegedések	Krónikus obstruktív tüdőbetegség	Antioxidáns, gyulladás gátló hatás	(Rangasamy és mtsai, 2004),
	Asztma	Antioxidáns hatás gyulladás gátló hatás	(Rangasamy és mtsai, 2005)
	Akut tüdősérülés	Antioxidáns, gyulladásgátló	(Chan és Kan, 1999)
	Tüdő fibrózis	Antioxidáns hatás	(Cho és mtsai, 2004)
	Respiratory syncytial vírusfertőzés	Antioxidáns hatás	(Cho és mtsai, 2009)
Idegrendszeri megbetegedés	Huntington-kór	Antioxidáns, gyulladásgátló	(Liot és mtsai, 2009)
	Alzheimer-kór	Antioxidáns, 26S proteaszóma indukálása	(Kanninen és mtsai)
	Parkinson-kór	Antioxidáns, gyulladásgátló	(Rojo és mtsai, 2010; Tufekci és mtsai, 2011)
	Szklerózis multiplex	Antioxidáns hatás	(van Horssen és mtsai, 2010)
Daganatos betegségek		Antioxidáns és detoxifikáló hatása miatt prevenciósan antitumor hatású, viszont elősegíti a transzformált sejtek túlélését is	(Lau és mtsai, 2008)
Kardiovaszkuláris betegségek	Érelmeszesedés	Ellentmondásos szerep: antioxidáns és immunmoduláló hatás	(Araujo és mtsai, 2012)
	Ischaemia-reperfúziós károsodás	Antioxidáns és sejtvédő hatása révén csökkenti az idegi, vese és májkárosodást	(Leonard és mtsai, 2006; Shah és mtsai, 2007)
	Diabetikus nefropátia	Antioxidáns, gyulladásgátló hatás	(Jiang és mtsai, 2010)
Immunológiai betegségek	Szepszis	Antioxidáns és immunmoduláló hatása véd a szepszis ellen	(Kong és mtsai, 2011)
	Autoimmunbetegségek: autoimmun encephalomyelitis, rheumatoid arthritis	Antioxidáns és immunmoduláló hatása csökkenti a betegség súlyosságát	(Johnson és mtsai, 2010; Wruck és mtsai, 2011)
Májbetegségek	Drog-indukálta májkárosodás	Detoxifikáló, sejtvédő funkció	(Aleksunes és Manautou, 2007)

A COPD-hez hasonlóan a neurodegeneratív betegségek egyik közös jellemzője a sejtek fokozott oxidatív terhelése, amely kialakulhat pl. a mitokondriális diszfunkció következtében (Calkins és mtsai, 2009). Az oxidatív stressz hozzájárul a sejtek

pusztulásához, amely a betegség progressziójához vezet (Kensler és mtsai, 2007). A mitokondrium II-es légzési komplexét gátló 3-nitropropionsav (3-NP) kezelés Huntington-kórhoz hasonló tüneteket váltott ki egér modellen, amely fokozott ROS képződéssel járt együtt (Brouillet és mtsai, 1999; Liot és mtsai, 2009). A 3-NP kezelés hatására az *nrf2-/-* egerekben hamarabb fejlődött ki a betegség, és nagyobb mértékben alakultak ki striatális léziók, mint a vad típusú állatokban. Kimutatták, hogy az Nrf2 aktivitásának fokozása csökkenti a léziók méretét és a 3-NP káros hatásait (Kensler és mtsai, 2007). Az Nrf2 elsősorban antioxidáns célgénjei révén segíti elő a sejt túlélését, emellett viszont részt vehet a neurodegeneratív betegségekre is jellemző gyulladás modulálásában.

Az előző két betegséggel ellentétben az NRF2-nek ellentmondásos szerepe van a tumoros betegségekben. Megfigyelték, hogy olyan növényi és kémiai hatóanyagok, amelyek aktiválják az NRF2-t, gátolják a tumorképződést, pl.: epigallokatekin-3-gallát (zöld teában), rezveratrol (szőlőben), oltipraz (Ramos-Gomez és mtsai, 2001; Surh és mtsai, 2005). Anti-tumor hatását az NRF2 jellegzetes célgénjeinek: antioxidáns enzimek, 2. fázisú biotranszformációs enzimek révén fejti ki, amelyek semlegesítik a karcinogén anyagokat illetve azok hatásait (Ramos-Gomez és mtsai, 2001; Surh és mtsai, 2005). Ezzel szemben egyre több adat mutatja, hogy a már kialakult tumorsejtekben az NRF2 aktiváció elősegíti a tumorsejtek adaptációját az extrém körülményekhez, valamint célgénjei részt vesznek a gyógyszerhatóanyagok detoxifikálásában illetve a sejtből való kijuttatásában (Lau és mtsai, 2008). Ily módon az NRF2 fontos szerepet tölthet be a tumoros elváltozások prevenciójában, ellenben tumorszelektív gátlása a kifejlett tumor esetén fokozhatja a kemoterápia sikerességét (Martin-Montalvo és mtsai, 2011).

1.2.2. Az SKN-1, az NRF2 Caenorhabitis elegans ortológjának bemutatása

Az NRF2 ortológ SKN-1 tárgyalása előtt röviden bemutatom a *Caenorhabditis elegans* modell-rendszert.

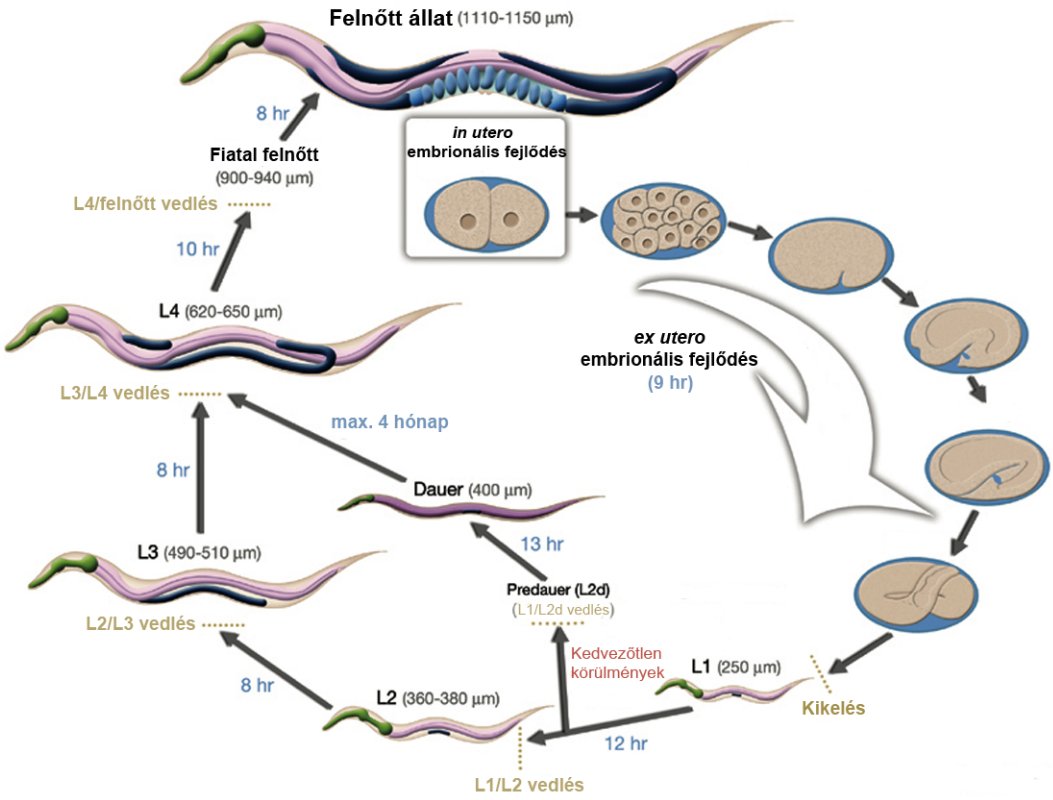
1.2.2.1. A Caenorhabitis elegans fonálféreg, mint modellállat

Sydney Brenner 1974-ben mutatta be a *Caenorhabditis elegans* fonálférget a genetika új modellállataként, amely azóta széles körben elterjedt a biológia más területein is (Brenner, 1974). A *C. elegans* valóban rendkívül kedvező tulajdonságokkal rendelkezik a genetikai vizsgálatokhoz: kisméretű (kb. 1 mm hosszú), rövid a generációs ideje (3 nap), elsősorban önmegtermékenyítéssel szaporodik (a populáció 99,8%-a hermafrodita, 0,2%-a hím) nagyszámú utódnemzedékkel (300 pete/anyaállat). A *C. elegans* fejlődése során 4 lárvastádiumon megy keresztül a felnőtt korig (**3. ábra**). Az L1 lárvák kedvezőtlen körülmények hatására, pl.: éhezéskor tartós, ún. dauer lárva állapotba alakulnak át, amelyből csak a stresszforrás elmúlásakor, akár több hónappal később lépnek vissza a normális fejlődési ciklusba (**3. ábra**).

A *C. elegans* természetes körülmények között a talajban és rothadó gyümölcsökön él, ahol baktériumokkal táplálkozik. Laboratóriumi körülmények között könnyű fenntartani, tápláléka az *Escherichia coli* OP50 törzs. Egyszerű felépítése, átlátszó teste lehetővé teszi sejtjei fénymikroszkópos vizsgálatát. A felnőtt állatot alkotó sejtek leszármazási vonalának meghatározása új lendületet adott a fejlődésbiológia és a sejtciklus/apoptózis kutatásnak (Sulston és Horvitz, 1977). Martin Chalfie hozott létre elsőként GFP-t expresszáló transzgénikus állatot, amellyel új utakat nyitott meg a génexpresszió és fehérje lokalizáció vizsgálatában (Chalfie és mtsai, 1994).

Más modellállatokhoz képest, pl. egér, gyorsabban és egyszerűbb módszerekkel lehet mutáns illetve transzgén *C. elegans* állatokat előállítani. Az utóbbi évtizedben pedig általánossá vált az RNS interferencia (RNSi) géncsendesítés alkalmazása, amely lehetővé teszi olyan gének szuppresszálását is, amelyekre korábban nem izoláltak mutáns állatot vagy hiánya embrionális letálist okozott (Fire és mtsai, 1998). Ez a technika tehát tovább bővítette a *C. elegans* állatok genetikai manipulálásának eszköztárát.

A *C. elegans* további előnye, hogy az interneten nagy mennyiségű, ingyenesen elérhető adatbázisok állnak a kutatók rendelkezésére, pl.: Wormbase, WormAtlas, WormBook (Girard és mtsai, 2007; Yook és mtsai, 2012). A *C. elegans* fentebb említett előnyei tették lehetővé egyre sokrétűbb alkalmazását, pl. a sejtbiológia, az immunológia, a stressz- és öregedéskutatás, illetve a gyógyszerkutatás területén.



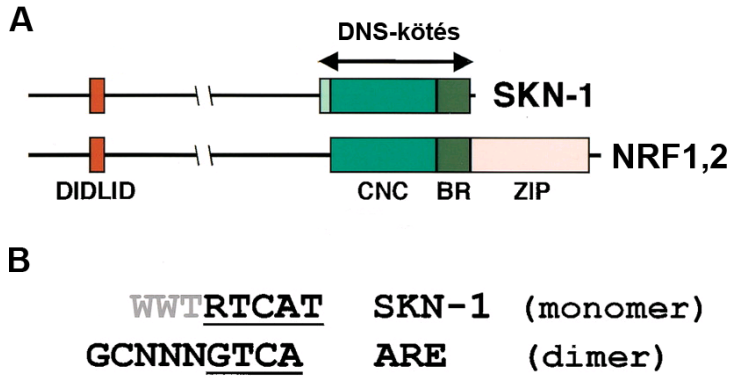
3. ábra A *Caenorhabditis elegans* fonálféreg egyedfejlődése

A *C. elegans* fonálféreg életciklusa pete állapotban kezdődik. A kikelést követően 4 lárvastádiumon keresztül éri el a felnőtt kort. Kedvezőtlen körülmények, pl. éhezés hatására az L1 lárvák kilépnek a fejlődési ciklusból és ún. dauer lárvává alakulnak. A dauer állapot a stresszhatás elmúlásáig, akár több hónapig is fennmaradhat, amelyet követően az L4 lárva stádiumba alakul és visszatér a normális életciklusba. Rövidítés: hr: óra. Az ábra a WormAtlas alapján készült. (http://www.wormatlas.org/hermaphrodite/introduction/Introframeset.html)

1.2.2.2. Az SKN-1 szerkezete és élettani jelentősége C. elegans fonálféregben

Az NRF1/2/3 transzkripciós faktorok *Caenorhabditis elegans* ortológja az SKN-1 fehérje. Az SKN-1 jelentősége elsőként a korai embrionális fejlődésben vált ismertté, anyai hatású génként koordinálja a mezendoderma kialakulását (Bowerman és mtsai, 1992). Az SKN-1 az NRF2-höz hasonló szerkezettel rendelkezik, viszont nem tartalmaz bZIP dimerizációs domént, monomerként kötődik a DNS-hez (**4. ábra**) (Blackwell és mtsai, 1994). Az SKN-1 által felismert DNS szekvencia két részre osztható. Áll egy fél

ARE-nek (antioxidáns válasz elemnek) megfelelő (RTCA) szakaszból, amelyhez az SKN-1 C-terminálisán található bázikus aminosavakat tartalmazó doménje kötődik. Ettől 5' irányban egy AT-ban gazdag szekvencia (WWT) helyezkedik el, amelyhez az SKN-1 homeodomén fehérjékhez hasonló N-terminális karja kapcsolódik (**4. ábra**) (Blackwell és mtsai, 1994). Az NRF2-höz hasonlóan az SKN-1 is képes toborozni a kromatin átszervezésben résztvevő CBP fehérjét (cAMP-válasz elem kötő fehérjét kötő fehérje) megnövelve a transzkripció indukálásának hatékonyságát (Walker és mtsai, 2000).

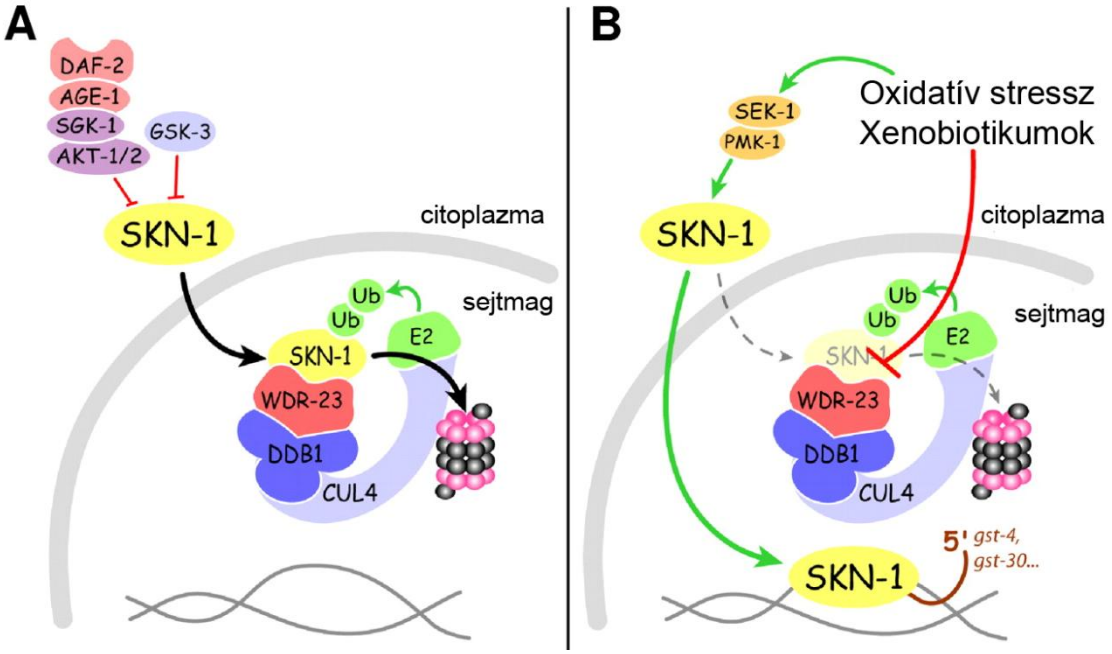


4. ábra Az SKN-1 és NRF1/2 szerkezete és DNS kötő szekvenciája

A) A *C. elegans* SKN-1 és az emlős NRF1/2 fehérjék domén szerkezete. Az SKN-1 a C-terminálison található bázikus aminosavakból álló CNC doménnel valamint az N-terminális homeodomén fehérjékhez hasonló karjával kapcsolódik a DNS-hez. Az SKN-1 nem tartalmaz a dimerizációhoz szükséges bZIP domént, így monomerként kötődik a DNS-hez. A Cnc-fehérjecsaládban csak az SKN-1 és NRF1,2 fehérjékben található meg a konzervált transzaktivátor DIDLID elem, amely mutatja ezen fehérjék közeli rokonságát. **B)** Az SKN-1 és NRF1,2 fehérjék által felismert DNS szekvenciák. Rövidítések: W: adenin vagy timin, R: adenin vagy guanin, N: bármelyik DNS bázist jelöli; ARE: antioxidáns válasz elem. Az ábra An és Blackwell alapján készült (An és Blackwell, 2003).

Az SKN-1 fehérjének három izoformája ismert. Míg az SKN-1A élettani jelentőségét eddig nem tárták fel, az SKN-1B és az SKN-1C eltérő funkciókkal rendelkezik. Az SKN-1B a *C. elegans* feji részén található ASI neuronokban expresszálódik, és szükséges a kalória restrikció élethosszt megnövelő hatásához (Bishop és Guarente, 2007). A bélhámsejtekben található SKN-1C az NRF2-höz

hasonlóan fontos oxidatív stresszválasz regulátor, emellett részt vesz az élethossz meghatározásában is (Tullet és mtsai, 2008). Ezt erősíti egy nemrégiben megjelent vizsgálat, amelyben kimutatták, hogy az élethossz regulátor TOR kináz is szabályozza az SKN-1 aktivitását (Robida-Stubbs és mtsai, 2012; Vellai és mtsai, 2003). Továbbá leírták, hogy az életkor előrehaladtával csökken az SKN-1 célgének expressziója a xenobiotikum/oxidálószer juglon kezelés hatására. Az SKN-1 csökkent aktivitása hozzájárulhat a sejtek adaptációjának romlásához, a fehérje-homeosztázis megbomlásához, így az öregedés kialakulásához (Li és mtsai, 2011; Przybysz és mtsai, 2009).



5. ábra Az SKN-1 szabályozása

A) Stresszmentes körülmények között az inzulin/IGF jelátvitel (IIS) terminális kinázai, az AKT-1/2, valamint a GSK-3 foszforilálja az SKN-1-et, amely proteaszomális degradációjához vezet. **B)** Oxidatív stressz valamint xenobiotikumok hatására aktiválódik a p38 MAPK útvonal, amely foszforilálja az SKN-1-et, elősegítve sejtmagi stabilizációját és célgénjei átírását, pl. *gst-4*, *gst-30* (glutation-S transzferáz 4 és 30). Az ábra Choe és mtsai alapján készült (Choe és mtsai, 2009).

Habár *C. elegans*-ban nem ismert az NRF2 elsődleges inhibitorának, a KEAP1-nak ortológja, illetve hozzá hasonló funkciót betöltő fehérje, az NRF2 és az SKN-1

szabályozásának mechanizmusa rendkívül hasonló. Stresszmentes körülmények között az SKN-1 a citoplazmában található, illetve ha bejut a sejtmagba, ubikivitinálódik és lebontódik a proteaszomális rendszer által (**5. ábra**) (Choe és mtsai, 2009). Oxidatív stressz hatására az SKN-1 stabilizálódik a sejtmagban és indukálja célgénjei átírását. Mindkét folyamatot kinázok szabályozzák. Nyugalmi állapotban az SKN-1 stabilizációját az inzulin/IGF jelátvitel kinázai, az AKT-1/2, valamint a GSK-3β (glikogén-szintáz kináz 3β) általi foszforiláció gátolja meg (An és mtsai, 2005; Tullet és mtsai, 2008). Az emlősökhöz hasonlóan *C. elegans*-ban is fontos szerepet töltenek be a stressz szignál továbbításában és a válaszreakciók aktiválásában a MAPK jelátviteli útvonalak (Ewbank, 2006). *C. elegans* fonálféregben oxidatív stressz hatására a p38 MAPK útvonal aktiválódik, amely az SKN-1-et foszforilálva elősegíti annak stabilizációját és célgénjei expresszióját (**5. ábra**) (Inoue és mtsai, 2005).

Az SKN-1 célgénjei között, az NRF2-höz hasonlóan, szerepelnek antioxidáns enzimek és 2. fázisú biotranszformációs enzimek, pl.: *gcs-1 (*γ-glutamil-cisztein szintetáz 1*), gst-4,* (glutation-S-transzferáz 4), *ctl-2* (kataláz 2), amelyek részt vesznek a sejtek homeosztázisának megőrzésében oxidatív stressz vagy xenobiotikum terhelés során (An és mtsai, 2003). 2009-ben publikált két *microarray* analízis kimutatta, hogy az SKN-1 a hagyományos SKN-1/NRF2 célgének mellett szabályozza olyan fehérjék expresszióját is, amelyek fehérjecsaládjaiba tartozó más génekről már ismert, hogy részt vesznek az immunválaszban, pl. CUB-szerű domént tartalmazó fehérjék, lizozimek, C-típusú lektinek, szapozinszerű fehérjék valamint neuropeptidszerű fehérjék (Alper és mtsai, 2007; Oliveira és mtsai, 2009; Park és mtsai, 2009). Így felmerül annak a lehetősége, hogy az SKN-1 a bélhámsejtek antioxidáns védelmén túl, közvetlenül részt vehet az immunválasz szabályozásában.

1.2.3. A C. elegans immunválaszának és immunszeneszcenciájának jellemzése

1.2.3.1. A C. elegans immunválasza

Az elmúlt évtizedben a természetes immunitás kutatásának új modellállatává vált a *Caenorhabditis elegans* fonálféreg. Az ember természetes immunitásához képest

a *C. elegans* jóval egyszerűbb immunrendszerrel rendelkezik (**2. táblázat**), viszont az általa nyújtott gazdag genetikai eszköztár lehetővé teszi a gazda-patogén kölcsönhatás alapjainak újszerű vizsgálatát (Pukkila-Worley és Ausubel, 2012). Az utóbbi években a gyógyszerfejlesztésben is elkezdték alkalmazni a *C. elegans* fonálférget pl. antimikrobiális szerek nagy mennyiségben történő gyors tesztelésére (Ewbank és Zugasti, 2011).

2. táblázat A *C. elegans* és az ember természetes immunitásának összehasonlítása

Az összefoglaló táblázat Gergely János és Erdei Anna által szerkesztett Immunbiológia valamint Ewbank és Zugasti, valamint Pukkila-Worley és Ausubel publikációi alapján készült (Ewbank és mtsai, 2011; Gergely J, 2000; Pukkila-Worley és Ausubel, 2012).

	Humán	***C. elegans***
Specializált immunsejtek	Granulociták, makrofágok, dendritikus sejtek, NK és NKT-sejtek, γ/δ T-limfociták, $CD5^+$ B-limfociták	Nincsenek
Egyéb immunfunkcióval rendelkező sejtek	Bélhámsejtek, endotél sejtek, keratinociták, vérlemezkék	Bélhámsejtek, epidermisz sejtek
Humorális faktorok	Komplement rendszer, citokinek, antibakteriális peptidek	Antimikrobiális fehérjék családjai (pl. SPP, lizozimek, ABF, CNC, lektinek)
Patogén felismerés	PRR-k (TLR-ek, *scavanger* receptorok, CD14, mannóz receptor); szolubilis faktorok (MBL/MASP, $C3H_2O$)	Korlátozottan ismert: CED-1/SCARF, SCAV-1/CD36, lektinek?, TOL-1?
Jelátviteli útvonalak	TLR, ERK/ JNK/ p38 MAPK, JAK/STAT, TGF-β és integrin jelátvitel	p38 MAPK, DAF-2, TGF-β és ERK jelátvitel
Kiemelt jelentőségű transzkripciós faktorok	NF-κB, AP-1, ATF-2, STAT-ok, IRF-ek	ATF7/ATF2, DAF-16/FOXO, ELT-2/GATA
ROS produkció	NOX2	BLI-3/DUOX
Szerepe	A „veszély” észlelése, az „idegen” partikulumok elpusztítása; antigén prezentáció és az adaptív immunválasz modulálása	Patogén-specifikus antimikrobiális fehérje repertoár, kórokozók elpusztítása
Targetjei	Kórokozók (baktériumok, gombák), vírussal fertőzött sejtek, tumorsejtek	Kórokozók (baktériumok, gombák)
Immunológiai memória	Az adaptív immunrendszer alakítja ki	Nem ismert

A *C. elegans* természetes közege gazdag potenciális patogénekben, amelyekkel szembeni védettség nélkülözhetetlen az állat túléléséhez (Pukkila-Worley és Ausubel, 2012). Ismertek bakteriális, fungális és virális kórokozói is, laboratóriumi körülmények között elsősorban humán opportunista baktériumokkal illetve gombákkal szembeni immunitását vizsgálják.

A *C. elegans* kórokozói a szájnyíláson, az epidermiszen, a vulván (ivarnyílás) és a végbélnyíláson keresztül képesek megtámadni az állatokat. Több patogén az állat felszínéhez asszociálva fordul elő. Azok a kórokozók, amelyek bejutnak az állatok kutikulával már nem borított szöveteire (pl. bél), elszaporodnak és elpusztítják a gazdaszervezetet. A laboratóriumban vizsgált patogének többsége intesztinális kórokozó, amelyek a szájnyíláson keresztül hatolnak az állat testébe (Darby, 2005). A szájnyílást két erőteljes őrlőmozgást végző garat követi, amely elpusztítja a bakteriális táplálék többségét, egyes kórokozók azonban képesek ezt túlélni és kolonizálják a fonálféreg bélcsövét, pl. *Pseudomonas aeruginosa, Enterococcus faecalis*. A bél lumenében a patogének elszaporodnak és toxinokkal károsítják a bélhámsejteket (Partridge és mtsai, 2010).

A *C. elegans* epidermisze kutikulával borított, amely impermeábilis a kórokozók számára. A *Drechmeria coniospora* gombafaj képes áthatolni a kutikulán és megtámadni az epidermisz sejteket, majd hífákat növesztve szétterjedni az állat egész testében (Pujol és mtsai, 2008). A *C. elegans* vulvája alaphelyzetben meggátolja a patogének bejutását, azonban az állat legyengülése során egyes kórokozók, pl. a *Drechmeria coniospora* vagy *Leucobacter chromiireducens* baktérium képes a vulván keresztül megfertőzni az állatot (Muir és Tan, 2008; Ziegler és mtsai, 2009). Végül a *C. elegans* rectális részét a *Microbacterium nematophilum* baktérium támadja meg, a hipodermisz sejtek és egyúttal a farok duzzadását okozva. A fertőzés súlyosabb esetben az állat sterilitását és székletürítésének blokkolását okozhatja (Nicholas és Hodgkin, 2004).

A legintenzívebben kutatott ágensek a Gram-negatív *Pseudomonas aeruginosa* és a Gram-pozitív *Enterococcus faecalis* humán opportunista patogén baktériumok, ezért doktori munkám során az állatok patogén rezisztenciájának vizsgálatára főként ezeket alkalmaztam. A következőkben ezen patogének által kiváltott immunválaszon keresztül mutatom be a *C. elegans* immunvédekezését.

Láthattuk, hogy a *C. elegans* immunrendszere jóval primitívebb, mint az ember természetes immunitása (**2. táblázat**), azonban képes indukálható, patogén-specifikus immunválasszal védekezni a kórokozókkal szemben. Habár az immunválaszban résztvevő jelátviteli útvonalakat, az aktiválódó antimikrobiális fehérjéket sikerült azonosítani, sajnos kevés adat áll rendelkezésünkre a patogéneket felismerő receptorokról. 2009-ben sikerült elsőként kimutatni, hogy két, humán *scavanger* receptorral homológ fehérje, a CED-1/SCARF és a SCAV-1/CD36 képes felismerni a *Cryptococcus neoformans* és *Candida albicans* gombafajokat, és mutációjuk fokozott érzékenységet okozott ezen kórokozókkal szemben (Means és mtsai, 2009). A humán természetes immunitás további PAMP receptorairól (patogén-asszociált molekuláris mintázat felismerő receptorok) eddig nem mutatták ki, hogy részt vesznek a *C. elegans* immunitásában. Megjegyzendő, hogy a Toll-szerű receptorokkal (TLR) ortológ TOL-1 mutációja ugyan nem okoz változást a *C. elegans* patogén rezisztenciájában, viszont szükséges a *Serratia marcescens* kórokozó elkerüléséhez, amely azt mutatja, hogy a TOL-1 részt vehet a patogén felismerésben (Pradel és mtsai, 2007; Pujol és mtsai, 2001). A *C. elegans* lektinek széles választékát szekretálja a bél lumenébe fertőzés során (Schulenburg és mtsai, 2008). Egyes lektinek (LEC-1-11) esetén azonosították a szénhidrát ligandokat, amelyek arra utalnak, hogy a lektinek szintén részt vehetnek a kórokozók felismerésében (Nemoto-Sasaki és mtsai, 2008). Sajnos egyik esetben sem sikerült a receptorok és a később bemutatásra kerülő immun-jelátviteli útvonalak közötti kapcsolatot azonosítani. A patogén-felismerő receptorok azonosítása megmagyarázhatja azt, hogyan képes a *C. elegans* fonálféreg patogén-specifikus immunválaszt adni a különböző kórokozókkal szemben.

A patogén-receptorokkal ellentétben számos, a *C. elegans* immunválaszában részt vevő jelátviteli útvonal vált ismertté az elmúlt évtizedben (**3. táblázat**). A *C. elegans* immun-jelátvitelében több, a humán természetes immunitásban is fontos útvonalat találhatunk, pl. p38 MAPK és TGF-β útvonal. Azonban egyes alapvető jelentőségű fehérjék, pl. NF-κB és MyD88 ortológjai nem találhatóak meg *C. elegans*-ban, ezen fehérjék kiestek a fonálféreg evolúciója során (Pukkila-Worley és Ausubel 2012). Így a *C. elegans* lehetőséget ad az NF-κB-től független természetes immunitás vizsgálatára, amelynek egyes elemei valószínűleg az emberben is megőrződtek.

3. táblázat A *C. elegans* immunválaszában részt vevő jelátviteli útvonalak

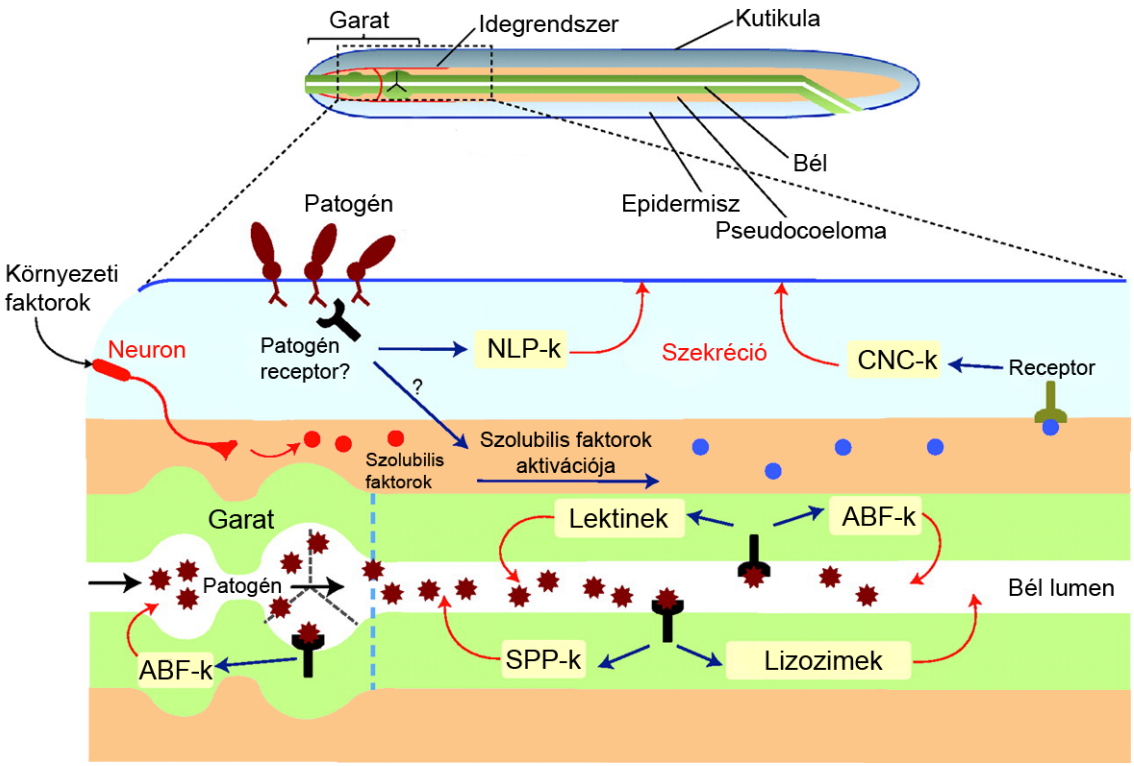
Jelátviteli útvonal	*C. elegans* fehérjék	Humán ortológok	Referencia
p38 MAPK útvonal	TIR-1	SARM	(Couillault és mtsai, 2004; Liberati és mtsai, 2004)
	RAB-1	Ras-hoz kapcsolt GTP-áz Rab-1A	(Couillault és mtsai, 2004)
	NSY-1	ASK1 MAPKKK	(Kim és mtsai, 2002)
	SEK-1	MKK3, MKK6 MAPKK	(Kim és mtsai, 2002)
	PMK-1	p38 MAPK α-δ	(Kim és mtsai, 2002)
	ATF7	ATF2	(Shivers és mtsai, 2010)
	VHP-1	MKP7 MAPK foszfatáz	(Kim és mtsai, 2004)
Inzulin/IGF jelátviteli útvonal	DAF-2	Inzulin/IGF-1 receptor	(Garsin és mtsai, 2003)
	AGE-1	Foszfatidil-inozitol-3 kináz	(Garsin és mtsai, 2003)
	AKT-1/2	Akt kináz	(Evans és mtsai, 2008a)
	DAF-16	FOXO transzkripciós faktor	(Garsin és mtsai, 2003)
TGF-β útvonal	DBL-1	TGF-β ligand	(Mallo és mtsai, 2002)
	SMA-6	I-es típusú TGF-β receptor	(Kurz és Tan, 2004)
	SMA-2	SMAD fehérje	(Kurz és mtsai, 2004)
	SMA-3	SMAD fehérje	(Kurz és mtsai, 2004)
	SMA-4	SMAD fehérje	(Kurz és mtsai, 2004)
ERK MAPK útvonal	LIN-45	B-Raf szerin/treonin fehérje kináz	(Nicholas és mtsai, 2004)
	MEK-2	ERK MAPKK2	(Nicholas és mtsai, 2004)
	MPK-1	ERK MAPK	(Nicholas és mtsai, 2004)

A *C. elegans* immun-jelátvitelének kutatása során elsőként Kim és mtsai alkalmaztak „*forward genetic screen*" eljárást patogén-szenzitív mutánsok izolálására. A vizsgálat során kimutatták, hogy a p38 MAPK útvonal szükséges a *P. aeruginosa* baktériummal szembeni rezisztenciához (Kim és mtsai, 2002). Az emlősök természetes immunitásában szintén fontos szerepet játszik a p38 MAPK útvonal, elsősorban az immunsejtek proinflammatórikus citokinekre illetve bakteriális LPS-re (lipopoliszacharid) adott válaszának szabályozásában (Kyriakis és Avruch, 2001). *C. elegans*-ban a p38 MAPK útvonal kináz-triádját az NSY-1 (MAP3K), a SEK-1 (MAP2K) és a PMK-1 (p38 MAPK) alkotják (Kim és mtsai, 2002). 2004-ben két kutatócsoport párhuzamosan fedezte fel, hogy immun-jelátvitel során a p38 MAPK útvonal felett egy adapter fehérje, a TIR-1/SARM (Toll/interleukin-1 rezisztencia

domén fehérje) helyezkedik el (Couillault és mtsai, 2004; Liberati és mtsai, 2004). A TIR-1 funkciója valószínűleg a jel továbbítása az eddig ismeretlen patogén-receptor és az NSY-1 között. A PMK-1 aktivitását a VHP-1 MAPK foszfatáz szabályozza, amely inaktív, defoszforilált állapotban tartja a fehérjét aktiváló jel, kórokozó hiányában (Kim és mtsai, 2004). A p38 MAPK útvonal végén az emlős ATF2 (aktiváló transzkripciós faktor 2) ortológ ATF-7 áll, amely *P. aeruginosa* fertőzés során számos immunválaszban résztvevő gén átírását aktiválja (Shivers és mtsai, 2010).

Az élethossz és a patogénekkel szembeni ellenállóképesség közötti kapcsolat vizsgálata során fedezték fel, hogy a hosszú életű *daf-2* (inzulin/IGF receptor) mutánsok több bakteriális patogénnel szemben (*P. aeruginosa, E. faecalis, Staphylococcus aureus*) is ellenállóbbak, mint a vad típusú állatok (Garsin és mtsai, 2003). A jelenség hátterében a DAF-16/FOXO transzkripciós faktor gátlás alóli felszabadulása áll, amely antioxidáns enzimek és antimikrobiális fehérjék expressziójának indukálásával járul hozzá az állatok fertőzésekkel szembeni ellenállóképességének növekedéséhez (Alper és mtsai, 2007; Garsin és mtsai, 2003; Kenyon és mtsai, 1993).

A legtöbb vizsgált kórokozó esetén mind a p38 MAPK, mind a DAF-16 aktivációját leírták az immunválasz során (Schulenburg és mtsai, 2008). Troemel és mtsai a két jelátviteli útvonal által szabályozott gének elemzése alapján feltételezik, hogy a DAF-16 alapszintű immunitást biztosít, míg fertőzés során a p38 MAPK útvonal felelős a nagyobb horderejű antimikrobiális válasz indukálásáért (Troemel és mtsai, 2006). Érdemes megjegyezni, hogy egyes kórokozók más jelátviteli útvonalakat is aktiválhatnak, pl. *Serratia marcescens,* illetve a *P. aeruginosa* aktiválja a TGF-β útvonalat, amely emlősökben részt vesz a gyulladási folyamat szabályozásában (Kurz és mtsai, 2004). A rektális patogén *M. nematophilum* baktériummal szembeni immunválasz során pedig az ERK (extracelluláris szignál-szabályozta kináz) útvonal aktiválódik (Nicholas és mtsai, 2004).



6. ábra A *Caenorhabditis elegans* immunválasza

A *C. elegans* immunválasza során intesztinális kórokozókkal szemben antimikrobiális fehérjék, pl.: lektinek, antibakteriális faktorok (ABF), szapozinszerű fehérjék (SPP) és lizozimek termelésével válaszolnak. Az epidermális kórokozókkal szemben neuropeptidszerű fehérjék (NLP) és caenacinok (CNC) szekréciója tapasztalható. A patogén-specifikus antimikrobiális fehérjék a kórokozók elpusztításában illetve azok virulenciájának csökkentésében vesznek részt. Az ábra Ewbank és Zugasti alapján készült (Ewbank és mtsai, 2011).

Fertőzés hatására a fent említett jelátviteli útvonalak antimikrobiális fehérjék expresszióját és szekrécióját indukálják a bélhámsejtekben. Az antimikrobiális fehérjék részt vesznek a patogének elpusztításában és/vagy virulenciájuk csökkentésében (Ewbank és mtsai, 2011) (**6. ábra**). A gerincesekben található granulizin és NK-lizin fehérjékkel mutatnak szerkezeti hasonlóságot *C. elegans*-ban a szapozinszerű fehérjék (SPP), amelyek elpusztítják a baktériumokat a citoplazmatikus membránjukon képzett pórusok segítségével (Roeder és mtsai, 2010). A lizozimek és a korábban már bemutatott lektinek családjába tartozó fehérjék is a bél lumenébe szekretálódva közvetlenül a kórokozó baktériumokon fejtik ki hatásukat (Alper és mtsai, 2007; Schulenburg és mtsai, 2008). A membrán integritásának megbontásával képes a

bakteriális kórokozók széles spektrumát elpusztítani az ABF-2 fehérje, amely a gerincesekben található defenzinekkel hasonlóságot mutató ABF-ek (antibakteriális faktorok) családjába tartozik (Kato és mtsai, 2002). A neuropeptidszerű és a rokon caenacin fehérjék elsősorban epidermális és vulvális fertőzések elleni védekezésben vesznek részt (Pujol és mtsai, 2008). A CUB-szerű doménnel rendelkező fehérjék jelentőségét *Yersinia pestis*-szel szembeni immunválasz során írták le, viszont a fehérjék hatásmechanizmusát eddig még nem tárták fel (Bolz és mtsai, 2010). A *C. elegans* immunválaszának specifikusságát és precíz szabályozását jól mutatja, hogy a különböző patogének jelentősen eltérő antimikrobiális fehérje-repertoárt indukálnak a bélhámsejtekben (Alper és mtsai, 2007; Schulenburg és mtsai, 2008).

2007-ben Chavez és mtsai kimutatták, hogy a *C. elegans* immunválasza során a bélhámsejtek antimikrobiális fehérjék szekréciója mellett ROS (reaktív oxigéngyökök) termelésével is védekeznek a kórokozókkal szemben, hasonlóan az emlősök neutrofil granulocitáihoz és makrofágjaihoz (Chavez és mtsai, 2007). *C. elegans*-ban fertőzéskor ROS-t generál a BLI-3 fehérje, amely a NADPH oxidáz és peroxidáz doménnel rendelkező DUOX fehérjék családjába tartozik (Chavez és mtsai, 2009). A *bli-3* gén csendesítése megnöveli a fonálférgek érzékenységét *E. faecalis* és *P. aeruginosa* baktériumokkal szemben (Hoeven és mtsai, 2011). Ez arra utal, hogy a BLI-3 által termelt ROS szükséges a megfelelő immunitás kialakításához *C. elegans*-ban.

Fertőzés során extrém környezet, elsősorban oxidatív stressz alakul ki a bél lumenében: a kórokozók által termelt toxinok, oxidatív ágensek valamint az immunválasz során a bélhámsejtek felszínén termelt ROS miatt (Bolm és mtsai, 2004; Chavez és mtsai, 2007; Darby, 2005; Moy és mtsai, 2004). Ezen stresszhatások mellett a bélhámsejtek intenzív antimikrobiális fehérjetermelést folytatnak, amely leterheli a sejtek fehérje homeosztatikus pufferének kapacitását (Mohri-Shiomi és Garsin, 2008). Fertőzés során aktiválódnak a főbb stresszválasz regulátorok, rámutatva arra, hogy a bélhámsejtek homeosztázisának megőrzése alapvető jelentőségű a hatékony immunválasz lefolytatásához *C. elegans*-ban. Ezen stresszválasz regulátorok közé tartozik a HSF-1 (hősokk faktor), amely fehérjék betekeredését (vagy felgombolyodását) segítő hősokk fehérjék expresszióját szabályozza; a DAF-16/FOXO, amely antioxidáns enzimek termelését indukálja fertőzés során; valamint az XBP-1, amely az ER stresszválasz egyik fő regulátora és szintén stresszfehérjék szintézisét

indukálja (Mohri-Shiomi és mtsai, 2008; Richardson és mtsai, 2010; Singh és Aballay, 2006a). A stresszválasz regulátorok immunitásban betöltött szerepének konzerváltságát mutatja, hogy nemcsak *C. elegans*-ban, hanem emlősökben is fontos szerepet játszanak a hatékony immunválasz kialakításában (Horowitz és Robinson, 2007; Hu és mtsai, 2011; Peng, 2008). Mivel az SKN-1/NRF2 mester regulátora az oxidatív és xenobiotikus stresszválasznak, feltehetően szintén részt vesz a bélhámsejtek homeosztázisának megőrzésében a *C. elegans* fertőzése során.

1.2.3.3. Az immunszeneszcencia emberben és C. elegans-ban

A nyugati társadalmak egyik legnagyobb kihívása az öregedő populáció következtében előálló gazdasági és egészségügyi problémák leküzdése. Időskorban megnő a kardiovaszkuláris, tumoros illetve neurodegeneratív betegségek gyakorisága, illetve fokozódik a fertőzésekkel szembeni érzékenység. Valamennyi felsorolt patológiás folyamat összefüggésbe hozható az immunrendszer időskori hanyatlásával, az immunszeneszcenciával (Agarwal és Busse, 2010).

Emlősökben, így az emberben is a hatékony, specifikus immunválaszt az adaptív immunrendszer biztosítja. Öregedés során azonban drámaian csökken az adaptív immunrendszer új antigénekkel szembeni válaszképessége, részben a vérbe kikerülő naív T- és B-limfociták számának csökkenése, valamint a fiatal korban rendkívüli variabilitást biztosító TCR (T-sejt receptor) és BCR (B-sejt receptor) repertoár beszűkülése miatt (Weiskopf és mtsai, 2009). A robusztus adaptív immunválasz elmaradása következtében megnő a szervezet első védvonalát alkotó természetes immunrendszer terheltsége. Habár a természetes immunsejtek mennyisége nem változik öregedés során, működésük számos ponton módosul. A dendritikus sejtek csökkent migrációs és fagocitotikus aktivitása hatással lehet antigénprezentáló képességükre, és így az adaptív immunválaszra is. Az antibakteriális védekezésben részt vevő neutrofil granulocitákról kimutatták, hogy az *in vitro* körülmények között megöregedett, szeneszcens sejtek alacsonyabb fagocitózis és ROS-termelő képességgel rendelkeznek (Shaw és mtsai, 2010). A neutrofil granulocitákhoz hasonlóan a természetes ölő sejtek és makrofágok citotoxikus aktivitása is csökken öregedés során. A jelenség hátterében

feltehetően egyes jelátviteli útvonalak alacsonyabb aktivitása áll. Kimutatták, hogy neutrofil granulocitákban a p38 MAPK, PI3K, Jak-STAT, PKB útvonalak, míg makrofágokban a p38 MAPK és JNK útvonalak indukálhatósága csökken öregedés során (Shaw és mtsai, 2010).

Összefoglalva tehát az emberi idős szervezetben az adaptív és természetes immunválasz csökkent hatékonysága tapasztalható, amelynek következménye a fertőzésekkel szembeni fokozott érzékenység illetve a védőoltásokra adott visszafogott válaszreakció. Ehhez társul a szervezet krónikus gyulladásos állapota, amely kedvez számos öregedéshez kapcsolódó patológiás folyamat kialakulásának, pl.: érelmeszesedés, Alzheimer-kór, csontritkulás, cukorbetegség (Franceschi és mtsai, 2000). Az immunszeneszcencia hátterében álló faktorok feltárása ily módon hozzájárulhat az öregedéshez kapcsolódó betegségek prevenciójához és kezeléséhez.

Az utóbbi években a *Caenorhabditis elegans* az immunszeneszcencia kutatásának legújabb modellállatává vált. Az emberhez hasonlóan a fonálféreg esetén is az életkor előrehaladtával tapasztalható a kórokozókkal szembeni fokozott érzékenység, az immunszeneszcencia (Laws és mtsai, 2004). A *C. elegans* immunválaszának legfontosabb effektor sejtjei a bélhámsejtek, amelyek integritása elengedhetetlen a megfelelő immunválasz kialakításához (Pukkila-Worley és Ausubel, 2012). Kimutatták, hogy az öregedő fonálférgekre általános szöveti leépülés jellemző, amely kiterjed a bélcsőre is (Garigan és mtsai, 2002). A bélhámsejtek működésének csökkent hatékonyságát mutatja, hogy az öreg állatok belében felszaporodik a táplálék *E. coli* OP50 baktérium, amely az állatok halálát okozhatja. Ezt támasztja alá, hogy az UV-val elölt vagy az osztódásban antibiotikummal gátolt OP50 baktériumon táplálkozó állatok 30-40%-kal hosszabb ideig élnek, mint azok, amelyeket élő OP50 baktériumon tartottak (Garigan és mtsai, 2002).

A *C. elegans* immunszeneszcenciájáról szóló első átfogó tanulmány megerősítette a kezdeti megfigyeléseket, vagyis a bél szöveti leépülésének jelentőségét az immunszeneszcencia kialakulásában (Youngman és mtsai, 2011). Emellett rámutattak arra, hogy az indukálható immunválasz koordinálásában központi szerepet játszó p38 MAPK/PMK-1-nek öreg állatokban (15 napos felnőttekben a 6 napos felnőttekhez képest) jelentősen visszaesik az aktiválhatósága, amely számos célgén nagymértékű expresszióbeli csökkenésével jár (Youngman és mtsai, 2011). Így

Youngman és mtsai a bél szöveti leépülése mellett a PMK-1 útvonal és az általa generált immunválasz alacsony hatékonyságát jelölték meg az immunszeneszcencia kialakulásának fő tényezőiként. Oxidatív stresszválaszban az SKN-1 egyik legfontosabb aktivátora a PMK-1 (Inoue és mtsai, 2005). Ezért érdemes megvizsgálni, hogy öregedés során tapasztalható PMK-1 csökkent aktivitás befolyásolja-e az SKN-1 működését, célgénjeinek expresszióját, amelyek a bélhámsejtek homeosztázisának megőrzésében vesznek részt stresszhatás során.

4. táblázat A *C. elegans* élethosszát és immunitását együttesen szabályozó gének

'+' a vad típus élethosszához/patogénrezisztenciájához képest növekedést, '-' csökkenést jelöl.

Gének	Funkcióvesztéses mutáció hatása az		Referenciák
	Élethosszra	Immunitásra	
daf-2	+	+	(Garsin és mtsai, 2003; Kenyon és mtsai, 1993)
age-1	+	+	(Friedman és Johnson, 1988; Garsin és mtsai, 2003)
daf-16	-	-	(Kenyon és mtsai, 1993), saját megfigyelés
dbl-1	+	-	(Luo és mtsai, 2009; Mallo és mtsai, 2002)
sma-6	+	-	(Luo és mtsai, 2009; Mallo és mtsai, 2002)
hsf-1	-	-	(Garigan és mtsai, 2002; Singh és mtsai, 2006a)
skn-1	-	?	(Hoeven és mtsai, 2011; Tullet és mtsai, 2008)

C. elegans fonálféregben az élethossz, patogénrezisztencia és stresszválasz szabályozása szorosan összefonódik (**4. táblázat**). E három folyamat szabályozásában kiemelt jelentősége van az inzulin/IGF jelátvitelnek. A DAF-2 receptor funkcióvesztéses mutációja megnöveli az élethosszt és az ellenállóképességet a fertőzésekkel illetve más stresszhatásokkal szemben (Garsin és mtsai, 2003; Kenyon és mtsai, 1993). Evans és mtsai rámutattak arra, hogy a DAF-2-től *downstream* a két folyamat szabályozásában eltérő komponensek vesznek részt (Evans és mtsai, 2008a). Míg a hosszú életű *pdk-1* (PI3K homológ) és *sgk-1* (SGK homológ) mutánsok vad típusú patogén rezisztenciát mutatnak, az élethosszt csak kismértékben befolyásoló *akt-1* és *akt-2* mutánsok nagyobb ellenállóképességgel rendelkeznek *P. aeruginosa*-val szemben. A DAF-2 útvonal legvégén egységesen a DAF-16/FOXO transzkripciós

faktor áll, amely az élethossz és a patogén rezisztencia esetén is célgénjei expressziójával járul hozzá a *daf-2* fenotípus kialakításához (Oh és mtsai, 2006; Schuster és mtsai, 2010).

Ismert továbbá, hogy az SKN-1 részt vesz az élethossz meghatározásában, valamint a DAF-16 mellett szükséges a *daf-2(e1370)* mutáns állatok hosszú élethosszának kialakításához (Tullet és mtsai, 2008). Az SKN-1-et mind az AKT-1/2, mind az SGK-1 képes foszforilálni. Így felmerül annak a lehetősége, hogy az SKN-1 nemcsak a *daf-2* mutáció okozta élethossz-növekedésben, de a fokozott patogénrezisztencia, késleltetett immunszeneszcencia kialakításában is részt vesz *C. elegans*-ban. A doktori munkámból készített közlemény benyújtása után megjelenő publikáció, eredményeimet megerősítve ki is mutatta az SKN-1 szerepét a *C. elegans* patogén rezisztenciájában (Hoeven és mtsai, 2011).

Az NRF2 szerepe az ember, illetve az emlősök immunszeneszcenciájában nem ismert, így az SKN-1 vizsgálata *C. elegans* modellállaton új irányt nyithat a humán NRF2-kutatás területén.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Doktori munkám középpontjában az NRF2 és *Caenorhabditis elegans* ortológjának, az SKN-1 funkcióinak, elsősorban az immunitásban betöltött szerepének bioinformatikai és kísérletes vizsgálata állt.

1. Az NRF2 bioinformatikai elemzésének főbb célkitűzései:

- Az emlős NRF2 interakciós partnereit tartalmazó adatbázis felépítése a kapcsolatokat leíró tudományos publikációk gyűjtésével.

- Az emlős NRF2 funkcióinak meghatározása valamint újabbak predikciója az interakciós partnerei funkcióinak elemzésével.

2. Az SKN-1 *C. elegans* modellállaton végzett vizsgálatainak főbb célkitűzései:

- Az SKN-1 *C. elegans* patogén rezisztenciájában betöltött szerepének jellemzése.

- Az SKN-1 szerepének elemzése a *C. elegans* immunszeneszcenciájában.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Az NRF2 bioinformatikai elemzéséhez felhasznált módszerek

Az NRF2 interakciós adatbázisának és funkcionális elemzésének módszertana a (Papp és mtsai, 2012b) közleményünkben került publikálásra.

3.1.1. Az NRF2 interakciós adatbázisának kiépítése

Kézi gyűjtéssel az irodalomban elérhető hivatkozások részletes átnézésével létrehoztam az NRF2-höz kapcsolódó fehérjék és célgénjeinek kísérletesen bizonyított interakciós adatbázisát. A lehetséges kapcsolódó partnereket az iHOP internetes keresővel (http://www.ihop-net.org (Hoffmann és Valencia, 2004)) kerestem ki. Az iHOP a PubMedben elérhető absztraktokban keres fehérje-interakciós adatokat. Azokat a cikkeket választottam ki, amelyekben az NRF2-t valamely emlős fajban (pl. humán, egér, patkány) vizsgálták. Az NRF2 és interakciós partnere közötti kapcsolatot leíró cikkből a korábban az intézetünkben kidolgozott, SignaLink nevű jelátviteli adatbázis készítéséhez használt gyűjtési protokollt használtam (Korcsmaros és mtsai, 2010). Ez alapján az egyes cikkekből a következő információkat gyűjtöttem ki:

- a kapcsolatban részt vevő fehérjék neve és UniProt azonosítója;
- a kapcsolat jellege: direkt/indirekt (azaz bizonyítottan közvetlen kapcsolatról van szó, vagy még nem ismert komponenseken keresztüli illetve nagyobb komplexen belüli kapcsolatról);
- a kapcsolat iránya;
- a kapcsolat hatása (serkentő/gátló);
- a kapcsolódó domének;
- a bekövetkező biokémiai módosítások pl. foszforiláció;
- milyen emlős fajban írták le a kapcsolatot.

Külön listát készítettem a nem fehérje-fehérje, hanem regulációs kapcsolatokról, amely az NRF2 és a célgénjei közötti kapcsolatot tartalmazták.

Ugyanezt a keresési módszert alkalmazva feltérképeztem az NRF2 legjelentősebb interakciós partnerének, a KEAP1 fehérjének kapcsolati rendszerét is, hiszen több fontos NRF2 szabályozási lépés a KEAP1 fehérjén keresztül valósul meg.

Amennyiben a kapcsolatot leíró cikkben további interakciós partnerek is szerepeltek, azokat is beillesztettem az adatbázisba, így az NRF2-vel illetve KEAP1-gyel kapcsolatot kialakító fehérjéket szabályozó fehérjék is bekerülhettek az adatbázisba. Valamennyi kapcsolat esetén megadtam a kapcsolatot leíró cikk PubMed azonosítóját, így az adatbázisban szereplő minden kapcsolat visszakereshető. Az adatbázis felépítése 2011 novemberében zárult le.

3.1.2. NRF2 funkcióinak feltérképezése

Az NRF2 interakciós adatbázisban szereplő fehérjék funkcióit és ezek statisztikai kiértékelését a GOTermFinder internetes alkalmazás (http://go.princeton.edu/cgi-bin/GOTermFinder (Boyle és mtsai, 2004)) segítségével végeztem el. A program alapértelmezett statisztikai kiértékelését használtam, és csak azon *Gene Ontology* (GO) biológiai folyamatokat használtam fel az elemzéshez, amelyek több mint 10 partner esetén fordultak elő. Az így kapott funkciólistát összevetettem az NRF2-höz rendelt GO funkciókkal és meghatároztam az új, az NRF2-höz nem rendelt funkciókat.

3.2. Az SKN-1 vizsgálatához felhasznált anyagok és módszerek

Az SKN-1 *C. elegans* immunitásában betöltött szerepének vizsgálatához felhasznált módszerek a (Papp és mtsai, 2012a) közleményünkben került publikálásra.

3.2.1. Caenorhabditis elegans törzsek

A doktori munkám során végzett kísérletekhez a következő törzseket használtam fel: N2 (vad típus), EU31 *skn-1(zu67)IV/nT1[unc-?(n754) let-?](IV;V),* KU25 *pmk-1(km25)IV.,* ZD101 *tir-1(qd4)III.,* amelyeket a Caenorhabditis Genetics Center-től szereztem be, valamint: LD001 *Is007 [skn-1::gfp],* CF1038 *daf-16(mu86)I.,* CB1370 *daf-2(e1370)III.* (Vellai Tibor, ELTE, Budapest), LD1171 *Is003 [Pgcs-1::gfp]* (T.

Keith Blackwell, Harvard Medical School, Boston MA) and MJCU017 *kIs17[gst-4::gfp, pDP#MM016B]X*. (Johji Miwa, Chubu University, Kasugai) törzseket.

3.2.2. Baktérium törzsek

A *C. elegans* fonálférgek laboratóriumi tápláléka az *Escherichia coli* OP50 baktérium törzs (Vellai Tibor, ELTE, Budapest).

Az RNS interferencia géncsendesítéshez különböző dsRNS-t termelő *E. coli* HT115(DE3) baktérium törzset alkalmazzák. A doktori munkám során a következő RNSi baktériumokat használtam fel: *cdc-25.1* (Andy Golden NIDDK/NIH, Bethesda MD), *skn-1* (T. Keith Blackwell, Harvard Medical School, Boston MA), *wdr-23* (Keith P. Choe, University of Florida, Gainesville FL), *vhp-1* és *tir-1* RNSi (Source BioScience Geneservice, Cambridge), valamint a kísérletekben kontrollként alkalmazott üres vektort (EV) tartalmazó baktériumokat.

A *C. elegans* fonálférgek immunitását két humán opportunista baktériumtörzzsel teszteltem: a Gram-negatív *Pseudomonas aeruginosa* PA14 törzzsel (David W. Wareham, Queen Mary University of London, London) és a Gram-pozitív *Enterococcus faecalis* SdB262 törzzsel (Jonathan J. Ewbank, Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy, Marseille).

3.2.3. C. elegans fonálférgek fenntartása

A fonálférgeket laboratóriumi körülmények között ún. NGM (Nematode Growth Medium) lemezen tartjuk fenn 15-20°C-os termosztátokban. Az NGM lemezek összetétele: 50 mM NaCl (Merck), 2,5 g/l pepton (BD), 17g/l agar (BioLab), 5 mg/l koleszterin (Sigma), 1 mM $MgSO_4$ (Sigma), 1 mM $CaCl_2$ (Merck), 25 mM KH_2PO_4 (Sigma) (pH=6,0). A 60 mm átmérőjű NGM lemezekre *E. coli* OP50 kultúrát cseppentve állíthatjuk elő a férgek táplálékául szolgáló baktériumpázsitot.

Mivel a hermafrodita *C. elegans* férgek elsősorban önmegtermékenyítéssel szaporodnak, fenntartásuk igen egyszerű. Az állatokat kisebb mennyiségben

platinatűvel, nagyobb mennyiségben az agar lemez egy darabjának kivágásával illetve a lemez felületének M9 pufferrel történő lemosásával lehet mozgatni egyik lemezről a másikra. Az M9 puffer összetétele: 40 mM Na_2HPO_4, 20mM KH_2PO_4, 85mM NaCl, 1mM $MgSO_4$.

3.2.4. C. elegans fonálférgek keresztezése

Az SKN-1 aktiváció mechanizmusának vizsgálatához két törzset hoztam létre keresztezéssel: *Pgcs-1::gfp;pmk-1(km25)* és *Pgcs-1::gfp;tir-1(qd4)* törzseket. A keresztezés során *Pgcs-1::gfp* hermafrodita állatokat kereszteztem *pmk-1(km25)* illetve *tir-1(qd4)* heterozigóta hímekkel. Mivel a populáció csak 0,1-0,2 %-ban tartalmaz hímeket, elsőként N2 vad típusú hímeket hoztam létre fiatal felnőtt hermafrodita állatok stresszelésével (5-6 óra 30°C-on). Stressz hatására megnő az utódgenerációban a hímek aránya, amelyek számát hermafroditákkal történő pároztatással lehet fenntartani. Az így kapott N2 hímeket kereszteztem az adott mutáns hermafroditákkal és ezek heterozigóta hím utódait használtam fel a *Pgcs-1::gfp* transzgén törzzsel történő keresztezéshez. A *Pgcs-1::gfp* törzs markerként tartalmaz egy *rol-6(su1006)* mutációt, amely „*roller*" fenotípust okoz, így az F2 generációt elsőként erre a fenotípusra szelektáltam. A *pmk-1(km25)* és *tir-1(qd4)* allélek deléciós mutációk, amelyeket polimeráz láncreakcióval (PCR) detektálhatunk genomi DNS-ből. A genotipizáláshoz két primer párt (Sigma) terveztem: az egyik primer pár a deléción kívül (OF, OR), a másik a deléción belül eső (IF, IR) szekvenciákkal komplement, így a PCR termékek méretéből egyértelműen el lehetett különíteni a heterozigóta illetve a homozigóta vad és mutáns allélt hordozó F2 állatokat (**5. táblázat**).

A 25 db F2 *roller* felnőtt állatot külön lemezre raktam, és egy napi peterakást követően lizáltam őket. Az F2 állatok lízise $MgCl_2$-mentes Taq pufferben 1 mg/ml proteináz K enzimmel PCR csőben történt. Az állatok kutikulájának feltörése érdekében elsőként 15 percig -80°C–on inkubáltam a csöveket. A lízis a továbbiakban PCR gépben (Eppendorf) zajlott:

1. 2 óra inkubálás 65 ^{o}C–on: az állatok lízise proteináz K által.
2. 15 perc inkubálás 95 ^{o}C–on: a proteináz K inaktiválása.

5. táblázat A *pmk-1(km25)* és *tir-1(qd4)* allélek genotipizálásához használt primerek

A primerek neveiben a gén neve mellett jelöltem, hogy a primer a deléción kívülre (O) vagy belülre terveztem (I), illetve melyek a *forward* (F) és *reverse* (R) primerek. *A *tir-1(qd4)* allél detektálása esetén a második PCR reakciót az *tir-1*-OF és *tir-1*-IR primerpárral végeztem el.

Primer	Szekvencia (5'-3' irányban)	PCR termék hossza	
		vad típusú allél	mutáns allél
***pmk-1*-OF**	GGATACGGAAGAAGAGCCAATG	1195 bp	882 bp
***pmk-1*-OR**	CAACAGTCTGCGTGTAATGC		
***pmk-1*-IF**	TCCTATAAGTTGCCATGACCTCAG	469 bp	nincs termék
***pmk-1*-IR**	CCCGAGCGAGTACATTCAGC		
***tir-1*-OF**	TGGGTAAATGAGGAAGAGAGAGAG	1368 bp	228 bp
***tir-1*-OR**	TCGGTTGACGAGTCGAATTTGG		
***tir-1*-IR**	CACAAGAACGTGCAACATCG	327 bp*	nincs termék

A lizátumok PCR reakcióit mindkét primer párral elvégeztem (**5. táblázat**) a hibalehetőségek minimalizálása érdekében. A reakciókhoz használt PCR elegy összetétele:

1x $MgCl_2$ mentes, KCl tartalmú Taq puffer

1,5 mM $MgCl_2$

0,2 mM dNTP mix

0,5-0,5 µM mindkét primerből

1,25 U/µl Taq DNS polimeráz

1 µl lizátum (50 µl PCR elegybe)

A PCR reakciókat a következő programmal végeztem el:

1. 3 perc 95 ^{o}C
2. 35 ciklus: 1 perc 95 ^{o}C
   0,5 perc 50 ^{o}C
   1,5 perc 72 ^{o}C
3. 5 perc 72 ^{o}C

A pozitív F2 egyedek utódai közül 12 roller állat genotípusát újra leellenőriztem PCR-rel. Azokat a vonalakat vittem tovább, amelyekben valamennyi F3 egyedben sikerült kimutatni a mutációt, és a roller egyedek aránya megközelítette a 100%-ot (a roller fenotípus penetranciája általában nem teljes mértékű).

3.2.5. Géncsendesítés „etetéses” RNS interferenciával C. elegans-ban

Az „etetéses” RNS interferencia (RNSi) módszer széles körben alkalmazott eljárás, amellyel lehetségessé válik egy adott géntermék expressziójának specifikus gátlása. A doktori munkám során a dsRNS-t termelő baktériumokat 16 órán keresztül növesztettem 100 µg/ml ampicillint (Sigma) tartalmazó LB tápoldatban (Sigma). Ezt követően a kultúrákat 100 µg/ml ampicillin, 12,5 µg/ml tetraciklin és 1 mM IPTG-t (izopropil β-D-1-tiogalaktopiranozid) tartalmazó NGM lemezekre szélesztettem. Több RNSi baktérium használatakor a különböző baktérium kultúrák egyenlő arányú keverékét alkalmaztam. Kontrollként az üres vektort tartalmazó HT115(DE3) baktériumot használtam.

Az RNSi hatásfokának növelése érdekében az anyaállatok peterakása két fázisban zajlott: kétszer 4 órában a megfelelő RNSi baktériumpázsiton (Shapira és mtsai, 2006). A kísérletekhez a második 4 óra alkalmával lerakott petékből kikelt állatokat használtam fel, amelyek a kikeléstől fiatal felnőtt korukig táplálkoztak az RNSi lemezen.

3.2.6. A patogén baktérium lemezek előkészítése patogén túlélési teszthez

A fonálférgek ellenállóképességének tesztelésére két humán opportunista baktériumtörzset használtam, a Gram-negatív *Pseudomonas aeruginosa* PA14 és a Gram-pozitív *Enterococcus faecalis* SdB262 törzset. A *P. aeruginosa* PA14 törzset LB médiumban (Sigma) növesztettem fel, és 35 mm átmérőjű módosított NGM lemezekre szélesztettem. A PA14 patogén túlélési teszthez használt lemezek összetétele pepton (3,5g/l) és agar (20g/l) koncentrációjukban tértek el az NGM lemezektől. A szélesztést követően 24 órán keresztül először 37°C-on, majd a patogenitás mértékének növelése céljából 25°C-on inkubáltam.

Az *E. faecalis* baktériumokat 100 µg/ml rifampicint tartalmazó BHI (Brain Heart Infusion) (BD) tápfolyadékban növesztettem fel. A kultúrát 35 mm átmérőjű a tápfolyadékkal megegyező összetételű agar lemezre szélesztettem, majd 16 órán keresztül 37°C-on inkubáltam (Powell és Ausubel, 2008).

3.2.7. Patogén túlélési teszt

A patogén túlélési tesztek alkalmasak az egyes *C. elegans* törzsek általános immunitásának összehasonlítására. A teszt beállításakor egyértelművé vált, hogy az alkalmazni kívánt mindkét baktérium törzs ún. „*bag of worms*" fenotípust indukált, vagyis az utódok még a peterakást megelőzően kikeltek az anyaállatokban azok halálát okozva. Azért, hogy kizárhassuk ezt a tényezőt, és csak a fertőzéssel szembeni ellenállóképességtől függjön az állatok túlélésének hossza, steril állatokat alkalmaztam a kísérletekben. A peteképzést az ivarsejtek és az embrió fejlődésében nélkülözhetetlen *cdc-25.1* gén RNSi baktériummal történő csendesítésével akadályoztam meg (Shapira és mtsai, 2006). Az azonos körülmények megőrzése érdekében valamennyi kísérletben *cdc-25.1(RNSi)* kezelt állatokkal dolgoztam.

A patogén túlélési teszthez az állatok 20°C-on nőttek fel *cdc-25.1(RNSi)* lemezen fiatal felnőtt állapotig. Kivételt képeztek ez alól a *daf-2(e1370)* mutánssal végzett kísérletek, amelyben 15°C-on nőttek az állatok, mivel a *daf-2(e1370)* férgek az általam alkalmazott kísérleti környezetben már 20°C-on dauer lárvát képeztek. Az öregedés hatásának vizsgálatához az állatokat a fiatal felnőtt kor elérését követően OP50-NGM lemezeken tartottam fenn 20°C-on a patogén túlélési teszt elkezdéséig.

A tesztekben 30-30 fiatal felnőtt állatot tettem az *E. faecalis* vagy *P. aeruginosa* lemezekre. Valamennyi kísérletben minimum 3 párhuzamos lemezzel dolgoztam körülményenként és legalább két független mérést végeztem el (külön jelezni fogom ahol ettől eltértem). A patogén túlélési teszteket 25°C-on végeztem és 12 óránként feljegyeztem a halott illetve élő állatok számát a populáció teljes kihalásáig. A halott állatokat többnyire egyértelműen fel lehetett ismerni (csak a kutikula maradt meg az állatok testéből). A kérdéses esetekben platinatű óvatos érintésére adott válaszreakció alapján határoztam meg az állatok állapotát: amennyiben nem mozdult meg az állat, halottként detektáltam. Feljegyeztem továbbá a Petri-csésze falán kiszáradt, illetve az agarba mászást követően elpusztult állatokat, amelyeket a statisztikai elemzésben cenzorált állatokként szerepeltek.

3.2.8. Az SKN-1 célgének aktiválásának vizsgálata fluoreszcens mikroszkópiával

Az SKN-1 két célgénjének: a *gcs-1* (γ-glutamin cisztein szintetáz) és a *gst-4* (glutation-S-transzferáz) expresszióját vizsgáltam GFP (zöld fluoreszcens fehérje) riporter törzsekkel. A P*gcs-1::gfp* törzsben a GFP-t 1840 bp-nyi *gcs-1* promóter szakasz és a GCS-1 fehérje első 17 N-terminális aminosavát kódoló nukleotidokhoz kapcsolták. Így a P*gcs-1::*GFP szintjének változása az SKN-1 transzkripciót aktiváló hatásáról ad információt (An és mtsai, 2003). A *gst-4::gfp* törzs 726 bp hosszú promóter szakaszt, majd a teljes genomi *gst-4* szekvenciát tartalmazza a GFP-től 5' irányban. Így a transzgén törzs vizsgálatakor a GST-4 fehérje mennyiségi változását is követhetjük (Hasegawa és mtsai, 2008).

Az fluoreszcens mikroszkópos vizsgálatokhoz L3 lárvákat inkubáltam *P. aeruginosa* lemezeken vagy a kontrollként szolgáló OP50 lemezeken 25°C-on. Az öregedés hatásának vizsgálatakor az állatokat a fiatal felnőtt kor elérését követően OP50-NGM lemezen tartottam a megfelelő kor eléréséig.

24 óra fertőzést követően az állatokat 40mM levamizolt tartalmazó M9 pufferben immobilizáltam 2% agaróz (Sigma) padon. Az állatokról Leica DMI6000B fluoreszcens mikroszkóppal DFC480 kamerával készítettem felvételeket a Semmelweis Egyetem Élettani Intézetében. Kondíciónként közel 60 állatot vizsgáltam meg és legalább kétszer ismételtem meg a kísérleteket. Feljegyeztem azon állatok számát, amelyek szemmel és 100 msec expozíciós idővel detektálható mennyiségben tartalmaztak, vagy nem tartalmaztak GFP-t a bélcsőben: ezzel elkülönítve a „GFP pozitív" és „GFP negatív állatok" csoportját.

3.2.9. Az SKN-1 lokalizációjának vizsgálata fluoreszcens mikroszkópiával

Az SKN-1 transzkripciós faktor aktiválását követően a citoplazmából a sejtmagba vándorol. Az aktivációt *skn-1::gfp* transzgén törzzsel vizsgáltam, amely 2,1 kb hosszú promóter szakaszt és az SKN-1C izoforma 533 aminosavát kódoló szekvenciát tartalmazza a GFP-t megelőzően (An és mtsai, 2003). Az SKN-1C a bélben expresszálódik, de utolsó 310 aminosava megegyezik az ASI neuronokban lokalizált

SKN-1B-vel, emiatt az SKN-1::GFP mindkét szövetben detektálható (Tullet és mtsai, 2008).

Az SKN-1::GFP lokalizációjának vizsgálatához L3 lárvákat M9 pufferrel *P. aeruginosa* vagy OP50 lemezekre mostam és 5 órán keresztül 25°C-on inkubáltam. Ezt követően a fent leírtak szerint előkészítettem a férgeket a fluoreszcens mikroszkópos vizsgálathoz. Kondíciónként legalább 15 féregről készítettem felvételt a Semmelweis Egyetem Élettani Intézetének Leica DMI6000B mikroszkópján DFC480 kamerával. A felvételeken megszámoltam, hogy a férgek 20 bélhámsejtje közül mennyiben látható nukleáris SKN-1::GFP. Az adatok ábrázolásához 4 csoportot különítettem el, attól függően, hogy az adott állat mennyi bélhámsejtében mutatható ki SKN-1::GFP a sejtmagban: nem tartalmaz SKN-1::GFP pozitív sejtmagot, 5-nél kevesebb, 5-15 közötti és 15-nél több sejtmagban detektálható SKN-1::GFP. Egy mérést legalább kétszer ismételtem meg.

A Semmelweis Egyetem Élettani Intézetében Szanda Gergő segítségével az állatokról Zeiss LSM510 konfokális lézer szkenning mikroszkóppal 40×/1.3 oil immerziós objektívvel (Plan-Neofluar, Zeiss) is készítettünk reprezentatív felvételeket.

3.2.10. Patogén túlélési teszt oxidatív előkezeléssel

Doktori munkámat megelőzően nem vizsgálták az oxidatív előkezelés hatását a *C. elegans* patogén rezisztenciájára, így elsőként a protokollt kellett beállítani. Az első kísérletekben a 2. napos felnőtt állatok stressztűrése nagyobbnak bizonyult, mint a fiatal felnőtteké, ezért a tesztekhez a korábbiaktól eltérően idősebb állatokat használtam fel. Tehát a 2. napos felnőtt állatokat különböző koncentrációjú: 1 mM, 1,5 mM and 2 mM hidrogén-peroxidot (Sigma) tartalmazó folyékony (agart nem tartalmazó) NGM oldatban inkubáltam két órán keresztül 12 lyukú lemezen (Greiner) 20°C-on. Kontrollként H_2O_2-ot nem tartalmazó folyékony NGM-t alkalmaztam. Az állatokat OP50-NGM lemezre pipettáztam és 12 óra „regenerálódási” szakaszt követően kezdtem meg a patogén túlélési tesztet. A leghatásosabb H_2O_2 koncentrációt meghatározó kísérletet egyszer végeztem el, ekkor a 2 mM H_2O_2-os előkezelés növelte meg

legnagyobb mértékben a patogén rezisztenciát, így a későbbiekben ezt alkalmaztam. A továbbiakban a fent leírt módon hajtottam végre a patogén túlélési teszteket.

3.2.11. C. elegans fonálférgek oxidatív toleranciájának mérése

Az állatok oxidatív toleranciájának összehasonlításához egypontos mérési módszert választottam. 35-35 fiatal felnőtt állatot 12 lyukú lemezben, 3 mM és 5 mM H_2O_2-ot tartalmazó folyékony NGM oldatban inkubáltam egy órán keresztül 20°C-on. Ezt követően OP50-NGM lemezre pipettáztam az állatokat, és 24 órával később feljegyeztem az életben maradt és halott állatok számát (a patogén túlélési tesztben leírt módszernek megfelelően). Kondíciónként 3 párhuzamos mintával dolgoztam, és a mérést kétszer ismételtem meg.

3.2.13. Az öregedés-függő SKN-1 célgének jellemzése

Az analízishez elsőként három *microarray* adatbázis átfedő elemeit határoztam meg. Ismert SKN-1 által szabályozott géneket (Oliveira és mtsai, 2009; Park és mtsai, 2009) kerestem azon 379 gén között, amelyek mennyisége a legnagyobb mértékben (kevesebb, mint tizedére) csökken öregedés során (a 15 napos felnőtt állatokban a 6 napos felnőttekhez képest) (Youngman és mtsai, 2011). Az így kapott 46 gén ismert funkcióit kigyűjtöttem a Wormbase adatbázisból (Yook és mtsai, 2012). Három funkcióra koncentráltam: oxidatív stressz vagy PA14 fertőzés során változik-e a gén expressziója, illetve PMK-1 által szabályozott-e a gén.

3.2.14. Statisztikai elemzés

Valamennyi statisztikai elemzést SPSS 15.0 szoftver (SPSS Inc.) segítségével végeztem el. A túlélési és élethossz görbéket Kaplan-Meyer *log-rank* teszttel elemeztem. Amennyiben több mérés által kapott adatok átlagát hasonlítottam össze, pl.:

SKN-1::GFP nukleáris lokalizáció, SKN-1 célgén aktiváció (P*gcs-1::gfp, gst-4::gfp*) és az oxidatív tolerancia mérése esetén egy utas ANOVA teszttel elemeztem az adatokat. A grafikonokon átlag ± SEM (standard error of means) szerepel. A szignifikancia határát $p<0,05$ értékben állapítottam meg, jelölése a grafikonokon: *, további jelölések: ** $p<0,001$, *** $p<0,0001$.

4. EREDMÉNYEK

4. 1. Az NRF2 funkcióinak vizsgálata bioinformatikai eszközökkel

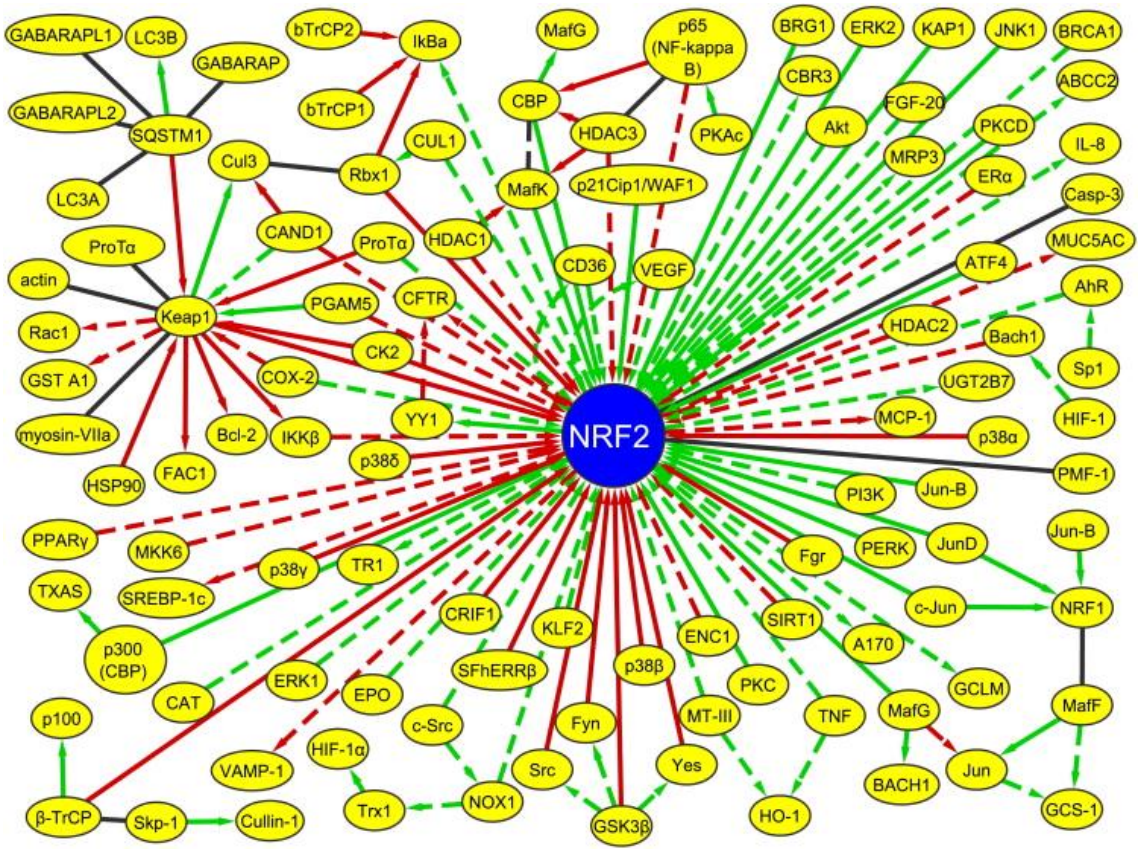
Az NRF2 interakciós adatbázisának és funkcionális elemzését a (Papp és mtsai, 2012b) tanulmányunkban közöltük.

4.1.1. NRF2 interakciós adatbázis

Az NRF2 transzkripciós faktor központi szerepet játszik az oxidatív stresszválasz kialakításában, de ismert antitumor és gyulladásgátló hatása is (Lau és mtsai, 2008). Az NRF2 további funkcióinak feltárását az NRF2-vel kapcsolatot kialakító fehérjék funkcióinak elemzésével terveztem. Így elsőként kézi gyűjtéssel létrehoztam az NRF2 interakciós partnereit tartalmazó adatbázist (**Melléklet táblázat**).

Az adatbázis 108 fehérjét, 131 irányított és 15 irányítatlan kapcsolatot tartalmaz. Az adatbázis fehérjéiből Fazekas Dávid kollégám a Cytoscape programmal készített hálózati ábrát (**7. ábra**) (Smoot és mtsai, 2011). Az NRF2 egyik legfontosabb interakciós partnere a KEAP1, így az adatbázis építésekor kiemelt figyelmet fordítottam a KEAP1-gyel kapcsolatot kialakító fehérjék adatbázisba történő felvételére. Habár a KEAP1 esetén az NRF2-re alkalmazott protokoll alapján gyűjtöttem a kapcsolódó partnereket, csak 17 KEAP1 interakciós partner (11,6%) szerepel az adatbázisban, és a kapcsolatok többségét, 57%-át az NRF2 interakciói alkotják (84 db).

Az adatbázis 131 irányított kapcsolatának 42%-a (55 db) gátló, míg 58%-a (76 db) aktiváló jellegű. Amennyiben ismert volt, a közvetlen kapcsolatok biokémiai mechanizmusát is rögzítettem az adatbázisban, amelyek többsége (főként leucin cipzár alapú) dimerizáció illetve foszforiláció volt. Részletek megtekinthetők a **Melléklet táblázat**ában.



7. ábra Az NRF2 interakciós hálózata

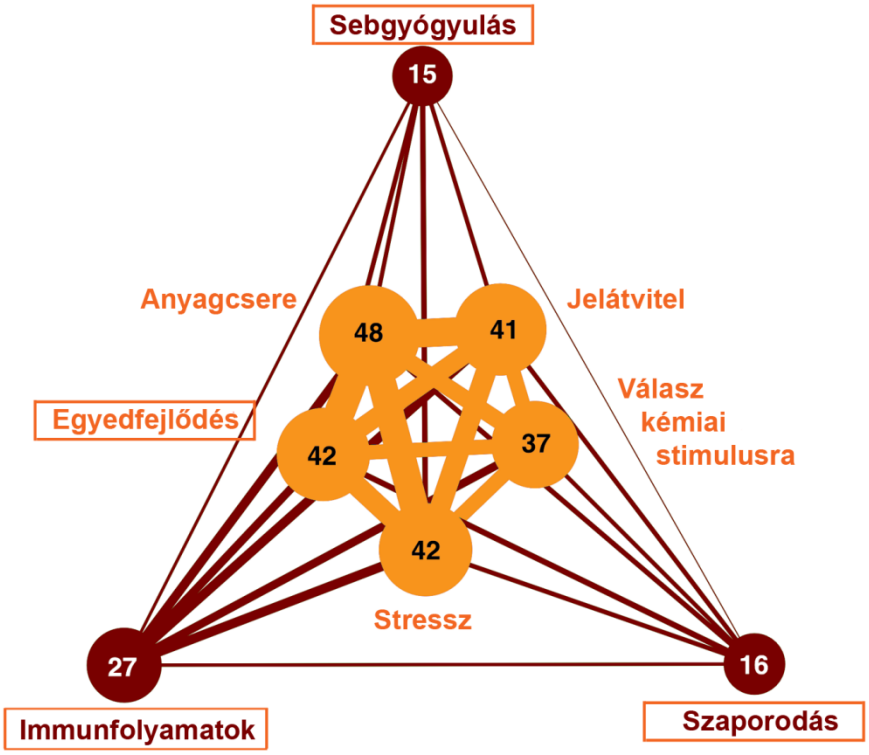
Az NRF2 interakciós hálózatát az NRF2 és a vele kapcsolatot létrehozó fehérjék, valamint az ezeket szabályozó első szomszédok alkotják. A nyíl színe a kapcsolat hatására utal: aktiváló (zöld) vagy gátló (piros). A folytonos nyíl a közvetlen kapcsolatokat, a szaggatott nyíl a közvetett kapcsolatokat jelöli.

4.1.2. NRF2 funkciók predikciója interakciós partnerek funkcióinak elemzésével

Az NRF2 biológiai folyamatokban betöltött szerepének részletesebb feltárásához az NRF2 interakciós partnerek GO (*Gene Ontology*) funkcióit vizsgáltam meg. A bioinformatikai elemzést Intézetünk LINK Hálózatkutató csoportja és az ELTE Genetikai tanszékén működő NetBiol Hálózatbiológiai csoportjával együttműködve végeztem el. Az NRF2 és partnereinek GO biológiai funkcióit összevetve nyolc fő funkciót azonosítottam (**8. ábra**). 30-35 NRF2-vel kölcsönható partner ugyanabban az öt biológiai funkcióban volt érintett: jelátvitel, stressz, válasz kémiai stimulusra, anyagcsere valamint egyedfejlődés. Egy kivételével valamennyi biológiai folyamatban ismert az NRF2 szerepe: az NRF2-nek eddig nem tulajdonítottak egyedfejlődési szerepet. Az elemzés rámutatott arra, hogy az NRF2 partnerek egyharmada multifunkcionális fehérje, vagyis több biológiai folyamatban is részt vesznek.

További három funkcionális csoportot különítettünk el, amelyek kisebb átfedést mutattak a korábbi öt funkcióval. Az immunfolyamatok (27 fehérje), szaporodás (15 fehérje) és sebgyógyulás (16 fehérje) funkciók szintén nem szerepeltek eddig az NRF2 GO funkciói között.

A



B

Funkcionális átfedések az NRF2 szomszédai között	Egyedfejlődés	Stressz	Anyagcsere	Válasz kémiai stimulusra	Jelátvitel	Immun-folyamatok	Szaporodás	Sebgyógyulás
Egyedfejlődés	**42**							
Stressz	32	**42**						
Anyagcsere	37	36	**48**					
Válasz kémiai stimulusra	29	29	30	**37**				
Jelátvitel	31	32	36	29	**41**			
Immunfolyamatok	22	25	24	22	25	**27**		
Szaporodás	16	13	14	12	13	10	**16**	
Sebgyógyulás	13	15	12	10	12	9	4	**15**

8. ábra Az NRF2 interakciós partnereinek GO funkciói és ezek átfedései

Az NRF2 interakciós partnerek GO funkcióinak elemzése megmutatta, hogy a legtöbb NRF2 partner több biológiai folyamatban is részt vesz. **A)** A számok az adott GO funkcióval rendelkező NRF2 partnerek számát jelölik, a vonalak vastagsága pedig arányos a közös, több funkcióval rendelkező elemekkel. A narancssárgával jelölt 5 db NRF2 funkció között nagy az átfedés (30-35 közös fehérje). Kevesebb interakciós partnerrel további 3 funkciót azonosítottunk (bordó színnel jelölve). Az interakciós partnerek GO funkcióinak felhasználásával 4 olyan biológiai funkciót találtunk, amelyek nem szerepelnek az NRF2 GO funkciói között (narancssárga keretben). **B)** A cellákban azon kölcsönható partnerek száma szerepel, amelyekre jellemző az adott biológiai funkció. A mátrix főátlója az adott funkcióra jellemző NRF2 partnerek számát, a többi cella az átfedéseket, a többfunkciós partnerek számát tartalmazza.

4.2. Az SKN-1 *C. elegans* immunitásában betöltött szerepének vizsgálata

Az SKN-1 *C. elegans* immunitásában betöltött szerepének vizsgálata során kapott eredményeket a (Papp és mtsai, 2012a) közleményünkben publikáltuk.

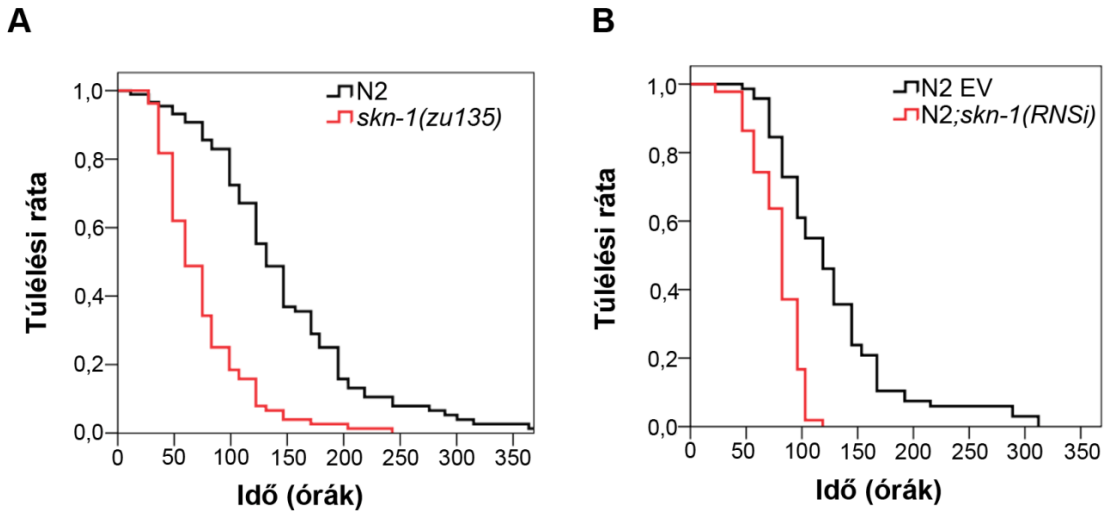
4.2.1. Az SKN-1 szükséges a megfelelő immunválasz kialakításához C. elegans-ban

Az NRF2 interakciós partnereinek elemzése rávilágított arra, hogy az NRF2-nek fontos szerepe lehet az immunrendszer működésében. *Caenorhabditis elegans* fonálféregben ismert, hogy az NRF2 ortológ SKN-1 részt vesz az élethossz és az oxidatív stresszválasz szabályozásában (Tullet és mtsai, 2008), viszont az immunitásban betöltött szerepét doktori munkámat megelőzően nem tárták fel.

Elsőként tehát azt vizsgáltam meg, hogy az SKN-1 hiánya hogyan befolyásolja az állatok túlélését patogén baktériumpázsiton. A túlélési tesztekhez az *skn-1(zu135)* allélt hordozó null mutánst alkalmaztam, amelyben egy korai stop kodon valamennyi SKN-1 izoforma expresszióját meggátolja. Az *skn-1(zu135)* mutáns férgek túlélését Gram-negatív *Pseudomonas aeruginosa* PA14, majd Gram-pozitív *Enterococcus faecalis* SdB262 baktériumon vizsgáltam meg. Az 1. napos felnőtt *skn-1(zu135)* állatok szignifikánsan rövidebb túlélést mutattak a vad típusú N2 törzshöz képest *P. aeruginosa* PA14 patogén baktériumon ($p<0,0001$, **9./A ábra**) (Papp és mtsai, 2012a). Az *skn-1* RNSi-vel történő csendesítése szintén csökkentette a férgek ellenállóképességét PA14-gyel szemben az üres vektort expresszáló (EV) baktériumon felnőtt kontroll állatokhoz képest ($p<0,0001$, **9./B ábra**).

Hasonló eredményt kaptam 2. napos felnőtt állatokkal végzett méréseken: PA14 baktériumon rövidebb az állatok túlélése SKN-1 hiányában ($p<0,0001$). Az utóbbi kísérleteket *E. faecalis* Gram-pozitív patogén baktériummal is megismételtem (Papp és mtsai, 2012a). Ez alkalommal is az *skn-1(zu135)* illetve *skn-1(RNSi)* állatok túlélése szignifikánsan rövidebb volt a kontroll állatokhoz képest.

Tehát a megfelelő immunitás kialakításához valóban szükség van az SKN-1 transzkripciós faktorra. Az SKN-1 *C. elegans* immunitásában betöltött szerepének vizsgálatához a továbbiakban *P. aeruginosa*-t alkalmaztam, mert a legtöbb információ a *P. aeruginosa* elleni immunválaszról áll a rendelkezésre.



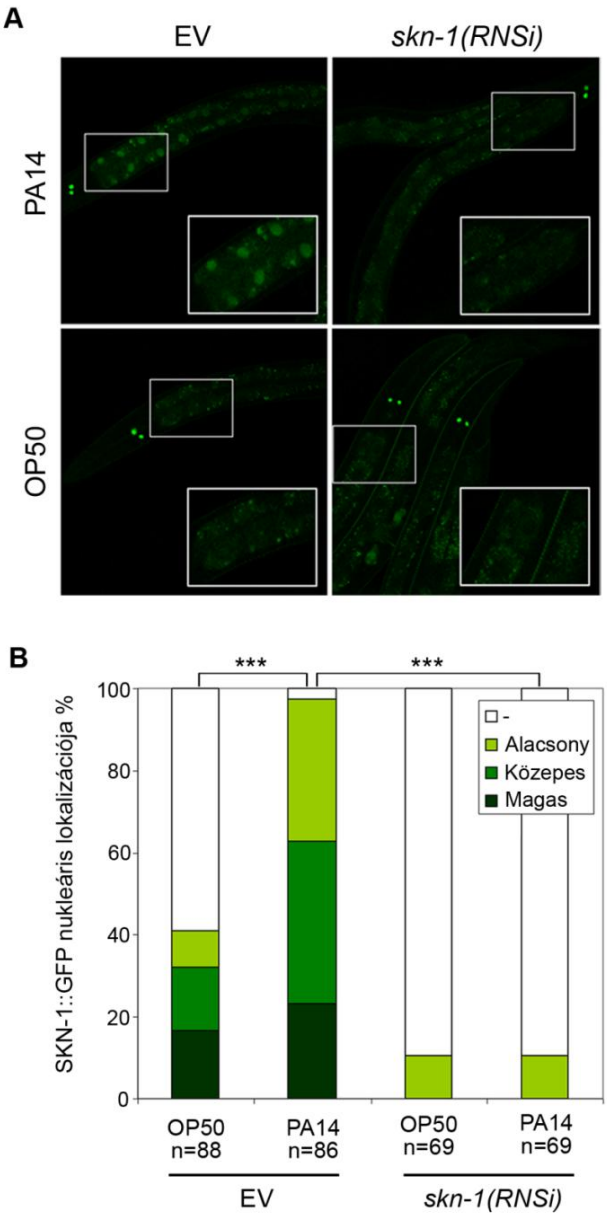
9. ábra Az *skn-1(zu135)* és az *skn-1(RNSi)* állatok túlélése *P. aeruginosa* baktériumon

(A, B) A null mutáns *skn-1(zu135)* illetve az *skn-1(RNSi)* állatok túlélése szignifikánsan rövidebb, mint az N2 vad típusú állatok (p<0,0001), illetve az üres vektort expresszáló baktériumon felnőtt N2 (EV) állatok túlélése (p<0,0001) patogén *P. aeruginosa* PA14 baktériumon.

4.2.2. SKN-1 aktiváció vizsgálata Pseudomonas aeruginosa fertőzés során

4.2.2.1. Az SKN-1 a sejtmagba transzlokálódik P. aeruginosa fertőzés hatására

Az SKN-1 transzkripciós faktor aktivációja során a sejtmagba transzportálódik (An és mtsai, 2003). Az SKN-1 fertőzés hatására bekövetkező aktivációjának bemutatásához L3 lárva stádiumú *skn-1::gfp* állatokat inkubáltam 5 órán keresztül *P. aeruginosa* PA14 illetve nem patogén *E. coli* OP50 baktériumon (**10./A, B ábra**). *P. aeruginosa* fertőzés hatására az állatok bélhámsejtjeiben szignifikánsan magasabb mennyiségben volt detektálható sejtmagi SKN-1::GFP, mint a kontroll állatokban (p<0,0001). *skn-1(RNSi)* kezelés hatására az állatok 90%-ában nem volt detektálható SKN-1::GFP a bélhámsejtek sejtmagjában, amely mutatja az *skn-1(RNSi)* kezelés hatékonyságának magas hatásfokát (**10./A, B ábra**).



10. ábra *P. aeruginosa* fertőzés hatására az SKN-1 a sejtmagba vándorol

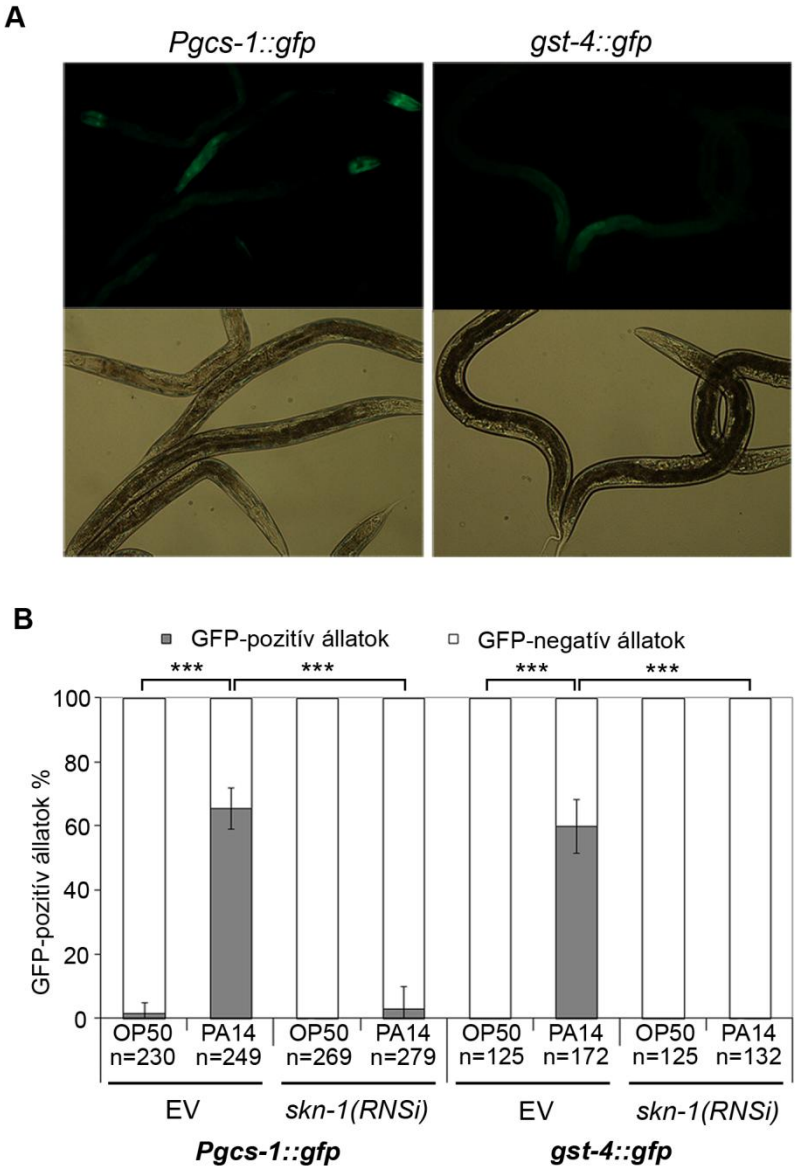
(A) Konfokális mikroszkóppal készített reprezentatív felvételek *skn-1(RNSi)* kezelt vagy kontroll, üres vektort expresszáló baktériumon (EV) nőtt *skn-1::gfp* L3 lárvákról 5 órás *P. aeruginosa* PA14 vagy *E. coli* OP50 baktérium-expozíciót követően. Megjegyzendő, hogy a fertőzésre specifikus választ adó SKN-1::GFP jel mellett a képeken látható a bélhámsejtek autofluoreszcenciája is, illetve SKN-1::GFP az ASI neuronokban, amely nem reagál az *skn-1(RNSi)* kezelésre. (**B)** A fluoreszcens mikroszkópos képek kiértékelése. A grafikonon öt mérés összesített adatait láthatjuk. Az állatokat három csoportba soroltam az adott állat SKN-1::GFP nukleárisan lokalizált bélhámsejtjeinek számától függően: '-' nem detektálható GFP-pozitív sejtmag, 'Alacsony' 1-4, 'Közepes' 5-15, 'Magas' 15-nél több bélhámsejtben található SKN-1::GFP a sejtmagban.

4.2.2.2. Az SKN-1 aktiválja célgénjei expresszióját P. aeruginosa fertőzés hatására

Az SKN-1 transzkripciós faktorként célgénjeinek átírását indukálja aktivációja során. A *P. aeruginosa* hatására bekövetkező SKN-1 aktivációt két célgén riporter törzs segítségével, a *Pgcs-1::gfp* és g*st-4::gfp* törzsekkel vizsgáltam (An és mtsai, 2003; Hasegawa és mtsai, 2008). Eddigi ismereteink szerint a *gcs-1* (γ-glutamil-cisztein szintetáz) transzkripcióját csak az SKN-1, míg a *gst-4* gént (glutation S transzferáz) az SKN-1 mellett a DAF-16/FOXO is szabályozza (Tullet és mtsai, 2008).

A célgén indukció bemutatásához a *Pgcs-1::gfp* és g*st-4::gfp* L3 lárvákat 24 órán keresztül inkubáltam *P. aeruginosa* vagy nem patogén *E. coli* OP50 baktériumon. Míg a kontroll OP50 baktériumon az alkalmazott expozíciós idő mellett alig detektálható GFP a bélhámsejtekben, PA14 hatására mindkét riporter törzsben szignifikánsan több állatban detektálható GFP expresszió a bélhámsejtekben ($p<0,0001$, **11./A,B ábra**). Tehát *P. aeruginosa* fertőzés során mind a *gcs-1* promóter transzaktivációja, mind a GST-4 expressziója fokozódik.

A két célgén SKN-1-függő módon aktiválódott *P. aeruginosa* fertőzés hatására, amelyet bizonyít, hogy *skn-1(RNSi)* kezelés alkalmával mindkét indukció elmaradt (**11./B ábra**).



11. ábra SKN-1 célgének aktivációja *P. aeruginosa* fertőzés során

(A) Fluoreszcens mikroszkóppal készített reprezentatív felvételek, amelyek a *Pgcs-1::*GFP és GST-4::GFP intesztinális expresszióját mutatják L3 lárva állatok 24 órás *P. aeruginosa* PA14 fertőzését követően. (**B)** Az (A) pontban leírt módon készített fluoreszcens mikroszkópos képek összesített kiértékelése. A grafikonon az (A) adatai mellett láthatók továbbá a kontroll, nem patogén OP50 baktériumon inkubált állatok, valamint az *skn-1(RNSi)* kezelt állatok adatai. Ezen kísérletekben az állatok L3 lárva állapotig üres vektort (EV) vagy *skn-1* elleni dsRNS-t (*skn-1(RNSi)*) expresszáló baktériumon táplálkoztak. A fluoreszcens mikroszkóppal készített további reprezentatív felvételek megtekinthetők a **Melléklet 2. ábráján**.

4.2.3. A P. aeruginosa-indukálta SKN-1 aktiváció szabályozásának vizsgálata

4.2.3.1. A PMK-1 részt vesz az SKN-1 aktivációjában P. aeruginosa fertőzés során

A *C. elegans* immunválaszában központi szerepet játszik a p38 MAPK ortológ PMK-1 fehérje (Kim és mtsai, 2002). Oxidatív stresszválasz során az SKN-1 egyik legfontosabb aktivátora a PMK-1 (Inoue és mtsai, 2005). Így felmerült annak a lehetősége, hogy a PMK-1 az immunválasz során is részt vehet az SKN-1 aktivációjában. Ennek eldöntésére *Pgcs-1::gfp* riporter konstrukció aktivációját vizsgáltam meg *pmk-1(km25)* null mutáns és vad típusú háttérben (**12./A, B ábra**). PMK-1 hiányában elmaradt a korábban tapasztalt *gcs-1* promóter aktiváció 24 órás *P. aeruginosa* fertőzést követően ($p<0,0001$).

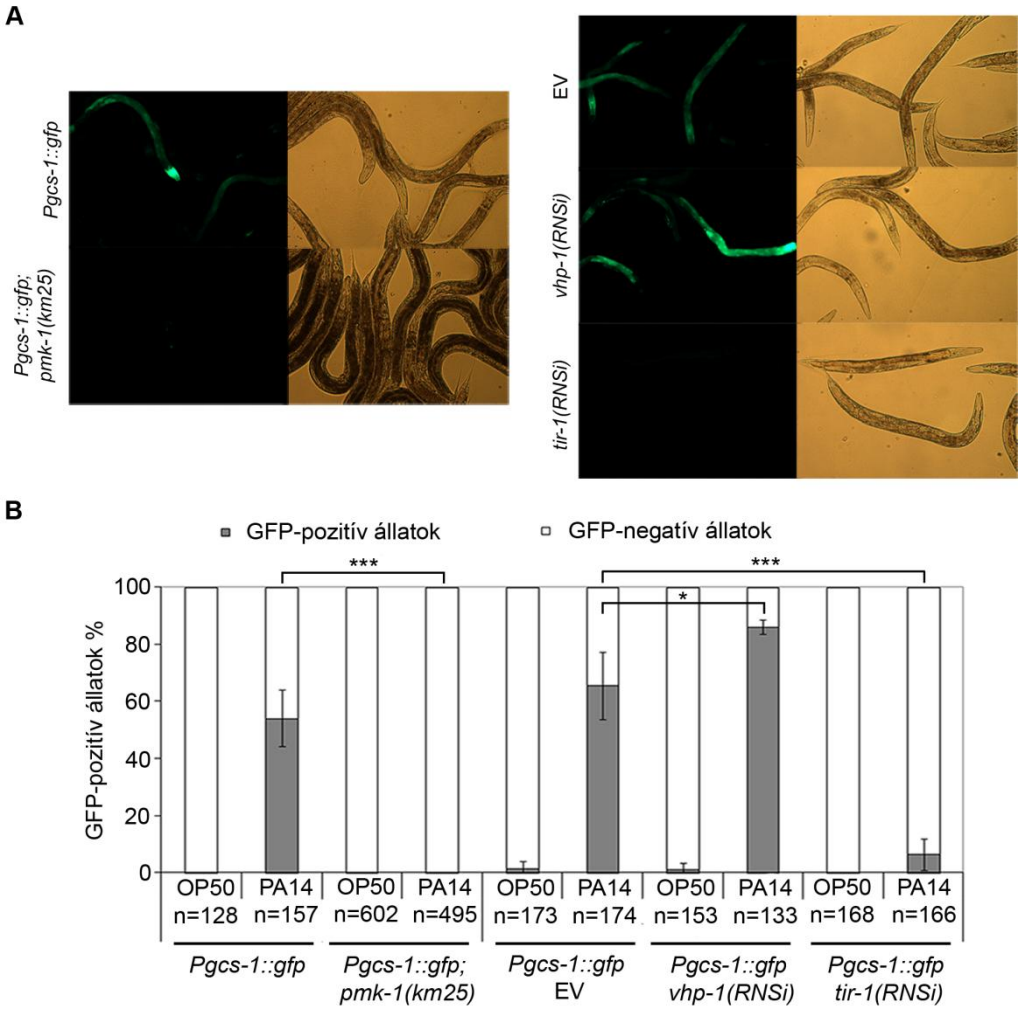
Stresszmentes körülmények között a PMK-1-et inaktívan, defoszforilálva tartja a VHP-1 kettős specificitású MAPK foszfatáz (Kim és mtsai, 2004). A *vhp-1* RNSi-val történő szupresszálása megnövekedett PMK-1 foszforilációhoz és *P. aeruginosa*-val szemben fokozott ellenállóképességhez vezet (Kim és mtsai, 2004). Habár a *vhp-1(RNSi)* állatok szignifikánsan nagyobb részében detektáltam *Pgcs-1::*GFP-t *P. aeruginosa* fertőzés után, mint az üres vektort expresszáló baktériumon (EV) felnőtt állatok esetében, ez a hatás a nem patogén OP50 baktériumon inkubált állatokban elmaradt (**12./B ábra**). Ezen eredmények rámutatnak arra, hogy *P. aeruginosa* fertőzés során a PMK-1 szükséges, de nem elégséges az SKN-1 aktivációjához, abban más faktorok is részt vesznek.

4.2.3.2. A TIR-1 szükséges az SKN-1 aktivációjához P. aeruginosa fertőzés során

A TIR-1 konzervált Toll/IL-1 rezisztencia (TIR) domént tartalmazó fehérje, amely a Toll-szerű receptor ortológ TOL-1 fehérjétől függetlenül képes aktiválni a p38 MAPK útvonalat *P. aeruginosa* fertőzés során (Couillault és mtsai, 2004; Liberati és mtsai, 2004). Ezért megvizsgáltam, hogy a TIR-1 részt vesz-e az SKN-1 aktivációjában *P. aeruginosa* fertőzés során. A *tir-1* RNSi-vel kezelt *skn-1::gfp* állatok bélhámsejtjeiben elmaradt a *P. aeruginosa* fertőzés hatására bekövetkező SKN-1

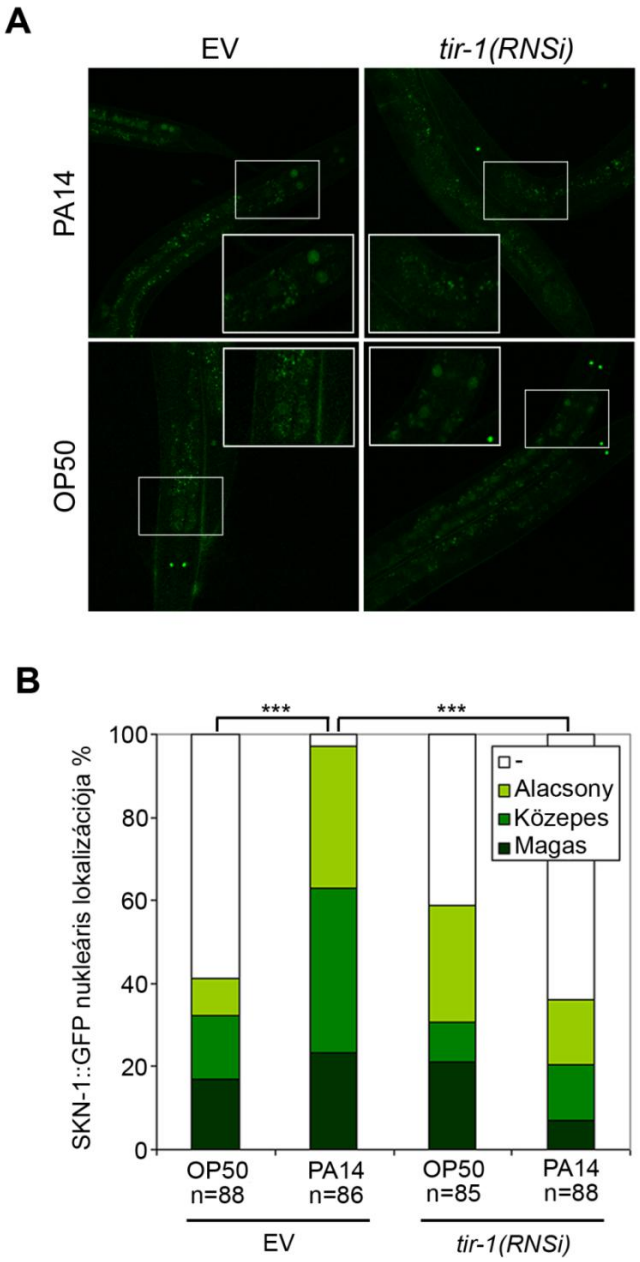
nukleáris transzlokáció, míg az SKN-1 alapállapotú elhelyezkedését nem változtatta meg (**13./A, B ábra**).

A *tir-1* RNSi-vel történő csendesítése megakadályozta továbbá a *P. aeruginosa* indukálta *Pgcs-1::gfp* riporter-aktivációt (**12./A, B ábra**). Hasonló eredményt kaptam *tir-1(qd4)* null mutáns háttér esetén (Papp és mtsai, 2012a).



12. ábra A TIR-1/PMK-1 útvonal szükséges a *P. aeruginosa* indukálta SKN-1 célgén expresszióhoz

(A) Fluoreszcens mikroszkóppal készített reprezentatív felvételek, amelyek a *Pgcs-1::*GFP expresszióját mutatják *pmk-1(km25)* mutáns, valamint *vhp-1(RNSi)* és *tir-1(RNSi)* állatokban 24 órás *P. aeruginosa* PA14 fertőzést követően. **(B)** Az (A) pontban leírt módon készített fluoreszcens mikroszkópos képek három mérés során készített összesített kiértékelése, kiegészítve a kontroll, nem patogén *E. coli* OP50 kezeléssel. EV: üres vektort expresszáló baktérium, amely az RNSi kísérletek kontrolljaként szolgál.



13. ábra TIR-1 szükséges a *P. aeruginosa* indukálta SKN-1 nukleáris lokalizációhoz

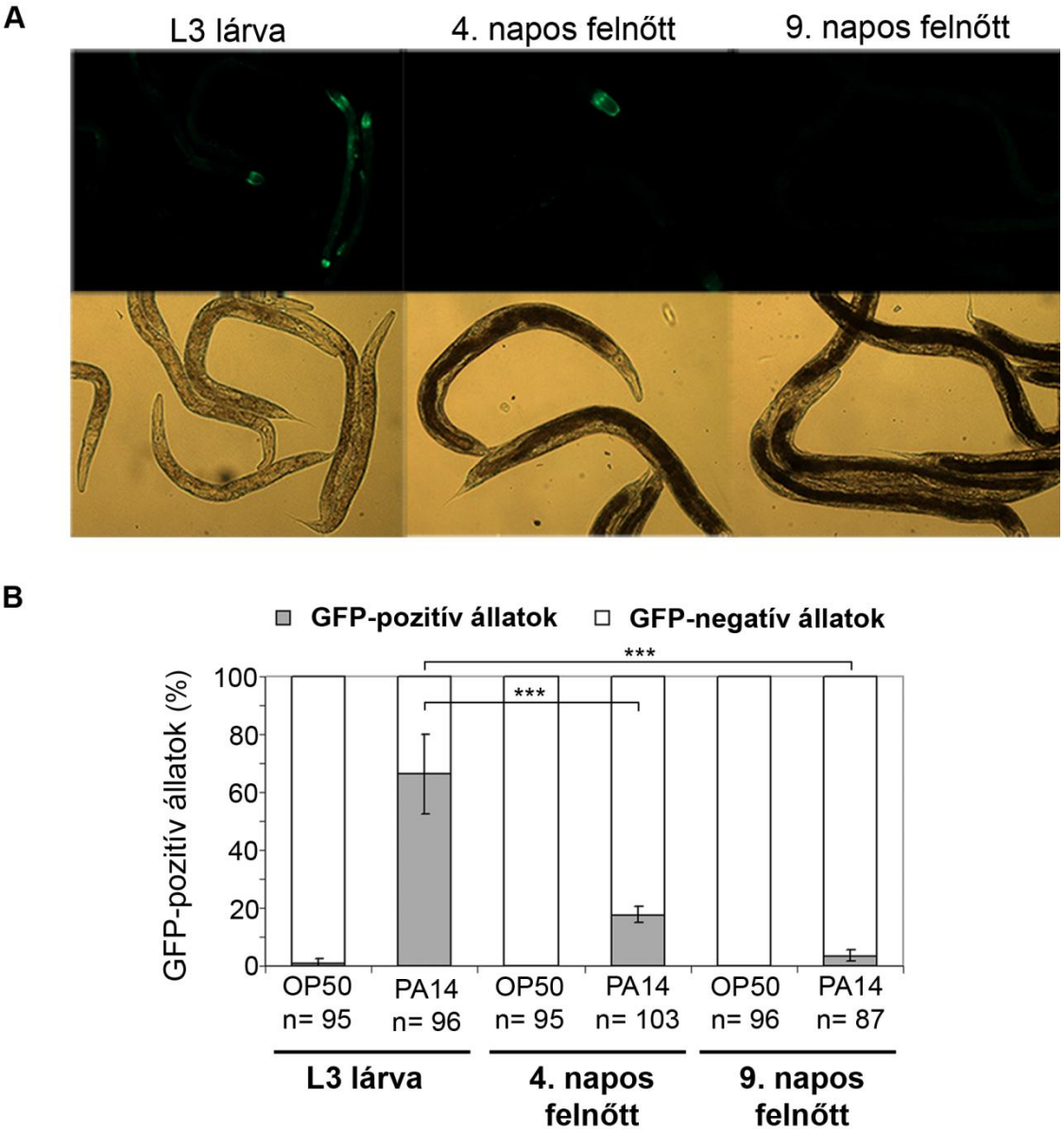
(A) Konfokális mikroszkóppal készített reprezentatív fluoreszcens felvételek, amelyek a SKN-1::GFP elhelyezkedését mutatják *tir-1(RNSi)* állatokban *P. aeruginosa* fertőzést követően. Az L3 lárva állatokat 5 órán keresztül inkubáltam *P. aeruginosa* PA14 vagy nem patogén *E. coli* OP50 baktériumon. (**B)** Az (A) pontban leírt módon készített fluoreszcens mikroszkópos képek kiértékelése. Megjegyzendő, hogy ezen adatok és a **10. ábra** adatai azonos kísérletekből származnak. Jelmagyarázat: '-' nem detektálható GFP-pozitív sejtmag, 'Alacsony' 1-4, 'Közepes' 5-15, 'Magas' 15-nél több bélhámsejtben lokalizált az SKN-1::GFP a sejtmagban. EV: üres vektort expresszáló baktérium, amely az RNSi kísérletek kontrolljául szolgál.

4.2.4. Az SKN-1 szerepének vizsgálata a C. elegans immunszeneszcenciájában

4.2.4.1. Öregedés során csökken a P. aeruginosa fertőzés indukálta SKN-1 aktiváció

Az immunszeneszcencia, vagyis az immunitás időskori hanyatlása általános jelenség az élővilágban. Az immunválasz hatékonyságának csökkenése érzékenyebbé teszi az öreg fonálférgeket a fertőzésekkel, pl. *P. aeruginosa* fertőzéssel szemben (Laws és mtsai, 2004; Youngman és mtsai, 2011). Az SKN-1 szükséges a megfelelő élethossz (Tullet és mtsai, 2008) és immunitás kialakításához. Mivel a két folyamat szoros kölcsönhatásban áll egymással, felmerült az SKN-1 szerepe az immunszeneszcencia kialakulásában.

Elsőként azt vizsgáltam meg, hogy az életkor hogyan befolyásolja a patogén-indukálta SKN-1 célgén expressziót. Ebből a célból L3 lárva, 4. és 9. napos felnőtt *Pgcs-1::gfp* állatokat inkubáltam 24 órán keresztül *P. aeruginosa* PA14 és kontrollként nem patogén *E. coli* OP50 baktériumon (**14./A, B ábra**). Az életkor előrehaladtával szignifikánsan csökken *P. aeruginosa* fertőzés hatására bekövetkező *Pgcs-1::*GFP expresszió ($p<0,0001$). Ez az eredmény rámutat arra, hogy az SKN-1 kisebb hatékonysággal képes aktiválni célgénjeinek átírását idős korban.



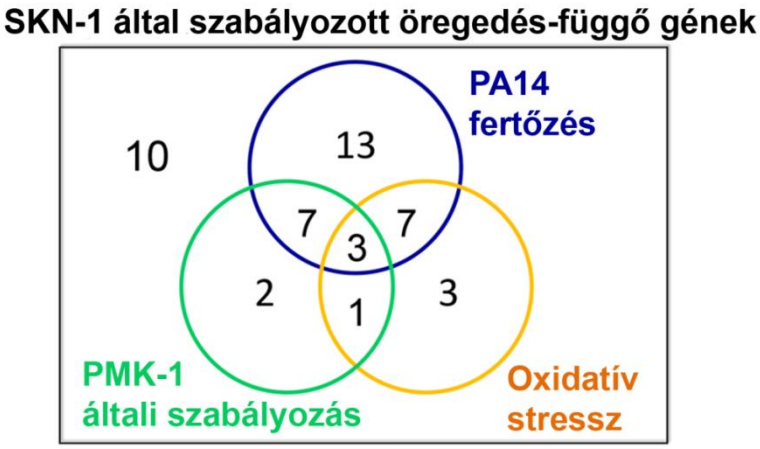
14. ábra SKN-1 célgén aktiváció csökken az öregedés során

(A) Fluoreszcens mikroszkóppal készített reprezentatív felvételek, amelyek a *Pgcs-1::*GFP expresszióját mutatják L3 lárva, 4. és 9. napos felnőtt állatok 24 órás *P. aeruginosa* PA14 fertőzését követően. **(B)** Az (A) pontban leírt módon készített fluoreszcens mikroszkópos képek összesített kiértékelése kiegészítve a kontroll, nem patogén *E. coli* OP50 kezeléssel.

4.2.4.2. Az SKN-1 által szabályozott öregedés-függő gének jellemzése

Az SKN-1 immunszeneszcencia kialakulásában betöltött szerepének vizsgálatát az irodalomban publikált *microarray* adatok bioinformatikai elemzésével folytattam. Youngman és mtsai meghatározták azon gének listáját (379 gén), amelyeknek expressziója legnagyobb mértékben (kevesebb, mint tizedére) csökken az idős állatokban (15. napos felnőttekben) a középkorúakhoz (6. napos felnőttekhez) képest (Youngman és mtsai, 2011). A 379 gén közül két, SKN-1-függő géneket vizsgáló *microarray* analízis segítségével (Oliveira és mtsai, 2009; Park és mtsai, 2009) 46 SKN-1 által szabályozott gént azonosítottam.

A 46 SKN-1 célgén expressziójának szabályozását a Wormbase internetes adatbázis (Yook és mtsai, 2012) adatait felhasználva elemeztem tovább. Elsősorban három kategóriára fókuszáltam: PMK-1 általi szabályozás, illetve befolyásolja-e a gének expresszióját az oxidatív stressz vagy a *P. aeruginosa* fertőzés. Ezen 46 gén között jelentős többségben voltak a PA14-függő SKN-1 célgének (65%) az oxidatív stressz (30%) vagy PMK-1 (28%) által szabályozott génekhez képest (**15. ábra**). A PA14-függő SKN-1 célgének nagy aránya az öregedés által szabályozott gének között tovább erősíti az SKN-1 szerepét az immunszeneszcencia kialakulásában.



15. ábra Az SKN-1 által szabályozott öregedés-függő gének jellemzése

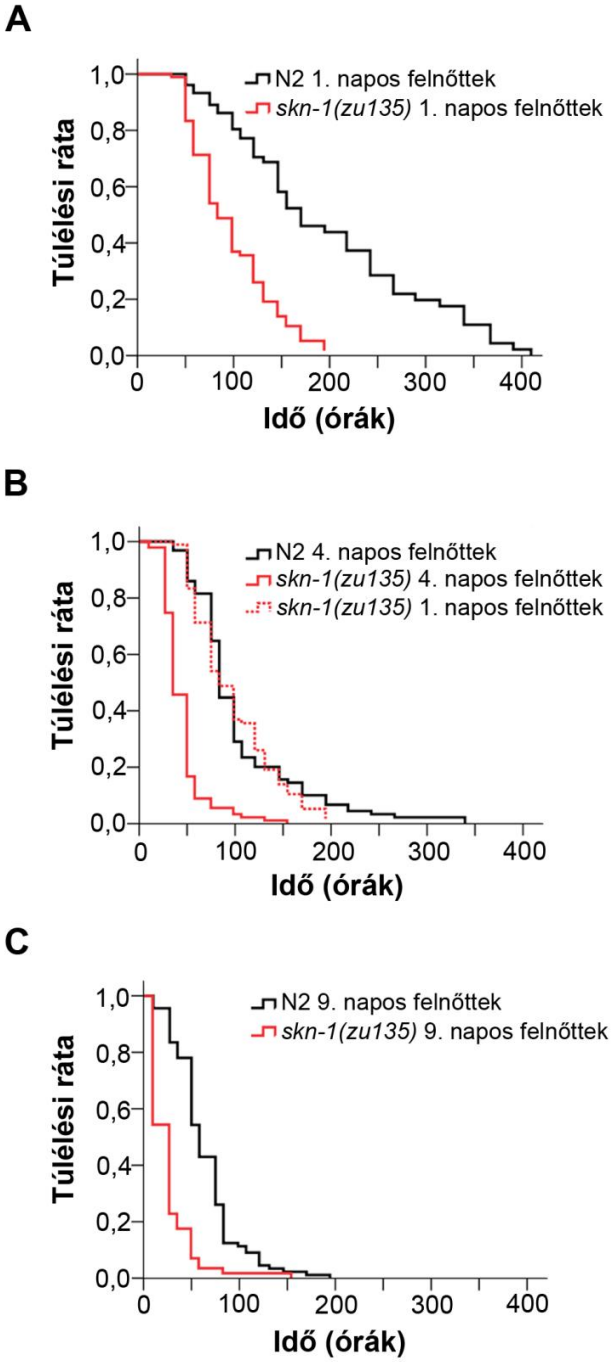
A venn-diagram megmutatja, hogy az öregedés-függő SKN-1 által szabályozott 46 gén között többségben vannak azon gének, amelyek expresszióját befolyásolja a *P. aeruginosa* PA14 fertőzés, habár eddig nem volt ismert az SKN-1 immunszeneszcenciában betöltött szerepe. A 46 gént három publikált *microarray* analízis eredményeként közölt génlisták metszetéből határoztam meg. A felhasznált génlisták: az öregedés során legnagyobb expresszió-csökkenést mutató gének (379 db) (Youngman és mtsai, 2011); az SKN-1 függő gének (Oliveira és mtsai, 2009); illetve az oxidatív stressz során SKN-1 által szabályozott gének listái (Park és mtsai, 2009). A metszetet alkotó 46 gént a Wormbase (Yook és mtsai, 2012) expressziós adatainak segítségével elemeztem tovább. 10 gén esetében nem ismert, hogy valamelyik faktor hatással lenne az expressziójára. Részletesebb adatok a Mellékletben találhatók (**Melléklet 3. táblázat**).

4.2.4.3. Öregedés hatása a P. aeruginosa bakteriális fertőzéssel szembeni ellenállóképességre

A továbbiakban megvizsgáltam, hogy az öregedés milyen hatással van a patogén rezisztenciára SKN-1 jelenlétében és hiányában. E célból 1., 4. és 9. napos N2 és *skn-1(zu135)* mutáns állatok túlélését teszteltem *P. aeruginosa* PA14 baktériumon.

Vad típusú háttérben már a 4. napos felnőtt állatok esetén tapasztalható az ellenállóképesség csökkenése (Laws és mtsai, 2004), amely hasonló volt az 1. napos felnőtt *skn-1(zu135)* mutáns állatok patogén rezisztenciájához *P. aeruginosa* baktériumon (p=0.1429) (**16./A, B ábra**). Valamennyi életkor esetén az *skn-1(zu135)* mutáns állatok szignifikánsan rövidebb túlélést mutattak az N2 állatok túléléséhez

képest (p<0,0001) (**16./A, B, C ábra**), rámutatva arra, hogy 9. napos felnőtt kor után is szükség van az SKN-1-re a megfelelő immunitás kialakításához.

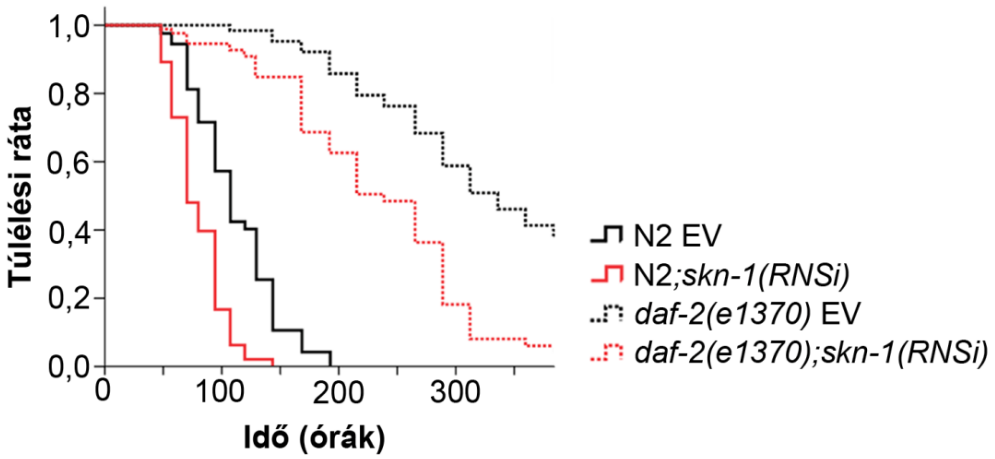


16. ábra Az életkor hatása a *P. aeruginosa*-val szembeni ellenállóképességre

(A, B, C) 1., 4. és 9. napos felnőtt vad típusú N2 és *skn-1(zu135)* mutáns állatok túlélése *P. aeruginosa* PA14 baktériumon. Az *skn-1(zu135)* mutáns állatok valamennyi életkor esetén rövidebb túlélést mutatnak az N2, vad típusú állatokhoz képest (p<0,0001). **(B)** Az 1. napos felnőtt *skn-1(zu135)* mutáns állatok túlélése hasonló a 4. napos felnőtt N2 állatokéhoz (p=0,1429).

4.2.5. SKN-1 szükséges a csökkent inzulin/IGF jelátvitel okozta fokozott immunitáshoz

Az inzulin/IGF receptor (DAF-2) funkcióvesztéses mutációja DAF-16 és SKN-1 függő módon növeli meg a stresszrezisztenciát és az élethosszt (Tullet és mtsai, 2008). Mivel a csökkent inzulin/IGF jelátvitel fokozott ellenállóképességet okoz *P. aeruginosa* fertőzéssel szemben (Garsin és mtsai, 2003), megvizsgáltam, hogy az SKN-1, szükséges-e a *daf-2(e1370)* mutánsok megemelkedett patogén rezisztenciájához (**17. ábra**). A korábban publikált eredményekkel (Garsin és mtsai, 2003) összhangban PA14 baktériumon a *daf-2(e1370)* mutánsok valóban hosszabb túlélést mutattak, mint a vad típusú állatok (p<0,0001). Az *skn-1(RNSi)* kezelés pedig csökkentette a *daf-2(e1370)* állatok megnövekedett túlélését (p<0,0001, **17. ábra**). Ezek az eredmények rámutatnak arra, hogy a *daf-2(e1370)* mutánsok fokozott patogén rezisztenciájához szükség van SKN-1-re.



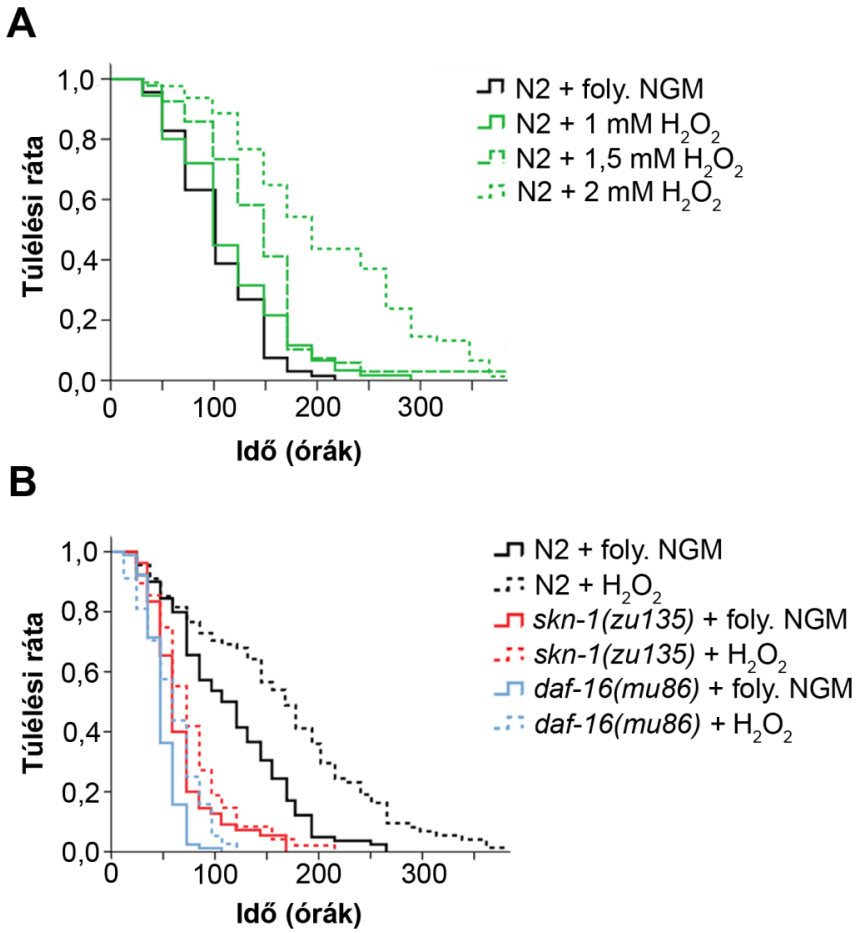
17. ábra Az SKN-1 szükséges a *daf-2* mutáns megnövekedett túléléséhez *P. aeruginosa* baktériumon.

A *daf-2(e1370)* mutáns állatok hosszabb ideig élnek *P. aeruginosa* PA14 baktériumon, mint a vad típusú N2 állatok (p<0,0001). Az *skn-1(RNSi)* kezelés csökkentette a *daf-2(e1370)* mutáns állatok megnövekedett túlélését *P. aeruginosa* baktériumon (p<0,0001). EV: 1. napos felnőtt korig üres vektort expresszáló baktériumon táplálkozó állatok, az RNSi kezelés kontrolljaként szolgál.

4.2.6. Oxidatív előkezelés megnöveli a C. elegans patogén rezisztenciáját és hatásához az SKN-1-et igényli

Enyhe oxidatív stressz megnöveli az élethosszt, ellenállóbbá tesz a nagy dózisú azonos, és kereszt-tolerancia kialakításával eltérő stresszhatásokkal szemben is (Cypser és Johnson, 2002). Az oxidatív hormézis patogén rezisztenciára gyakorolt hatásának vizsgálatához az állatokat 1 mM, 1,5 mM és 2 mM H_2O_2 oldatokban inkubáltam a *P. aeruginosa* túlélési tesztet megelőzően. A H_2O_2 koncentrációfüggő módon megnövelte az N2 állatok túlélését *P. aeruginosa* baktériummal szemben ($p=0,4253$, $p<0,0001$, $p<0,0001$, **18./A ábra**). 2 mM H_2O_2 koncentráció mellett érte el a legnagyobb hatást az oxidatív előkezelés, ekkor a túlélés kétszeresére emelkedett, ezért a továbbiakban 2 mM H_2O_2 koncentrációt alkalmaztam. Az oxidatív kezelés beállítását szolgáló kísérletet egyszer végeztem el.

2 mM H_2O_2-os előkezelésre az *skn-1(zu135)* mutáns állatok jelentősen kisebb választ adtak, mint az N2 vad típusú állatok ($p=0,0156$ vs. $p<0,0001$, **18./B ábra**). Az oxidatív előkezelés hormetikus hatásának további szabályozó faktora a DAF-16/FOXO fehérje lehet, hiszen a *daf-16(mu86)* funkcióvesztéses mutáns állatok szintén jelentősen kisebb választ adtak az oxidatív előkezelésre ($p=0,0304$ vs. $p<0,0001$, **18./B ábra**). Ezek az eredmények rámutatnak arra, hogy az oxidatív előkezelés által kiváltott fokozott patogén rezisztencia hátterében az SKN-1 és a DAF-16 antioxidáns transzkripciós faktorok állhatnak.



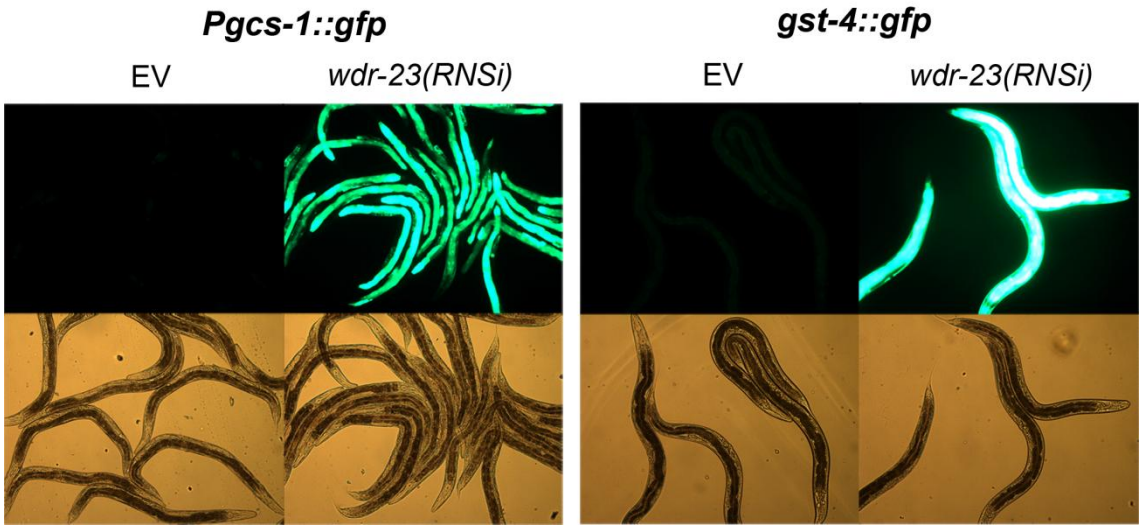
18. ábra Az oxidatív előkezelés megnöveli a patogén rezisztenciát *P. aeruginosa*-val szemben

(A) A H_2O_2 előkezelés koncentrációfüggő módon megnöveli az N2 vad típusú állatok túlélését *P. aeruginosa* PA14 baktériumon: 1 mM (p=0,425), 1,5 mM (p<0,0001) és 2 mM (p<0,0001). A leghatékonyabb H_2O_2 koncentrációt meghatározó patogén túlélési tesztet egyszer végeztem, 90 db 2. napos felnőtt állat/kondícióval. **(B)** Az oxidatív hormézis hatása jelentősen kisebb mértékű volt az *skn-1(zu135)* (p=0,0156) és a *daf-16(mu86)* (p=0,0304) állatok esetén, mint a vad típusú N2 állatokban (p<0,0001).

4.2.7. Az SKN-1 hiperaktiváció csökkenti a C. elegans patogén rezisztenciáját

A korábbiakban kimutattam, hogy az SKN-1 hiánya csökkenti a patogén rezisztenciát *P. aeruginosa* baktériummal szemben. Eredményeimet szerettem volna megerősíteni az SKN-1 overexpresszió vagy stabilizáció hatásának vizsgálatával.

A WDR-23 fehérje stresszmentes körülmények között a proteaszomális lebontás felé irányítja az SKN-1-et. A *wdr-23* csendesítése RNS interferenciával az SKN-1 stabilizációjához vezet, amely megnöveli az állatok oxidatív toleranciáját és élethosszát (Choe és mtsai, 2009). A *wdr-23(RNSi)* kezelés jelentősen megnövelte az SKN-1 célgén riporterek, a *Pgcs-1::*GFP és a GST-4::GFP expresszióját (**19. ábra**). A *wdr-23(RNSi)* kezelés nagyságrendekkel intenzívebb expressziót váltott ki a riporterekben, mint a *P. aeruginosa* fertőzés (*v.ö.* **19.** és **11. ábra**).

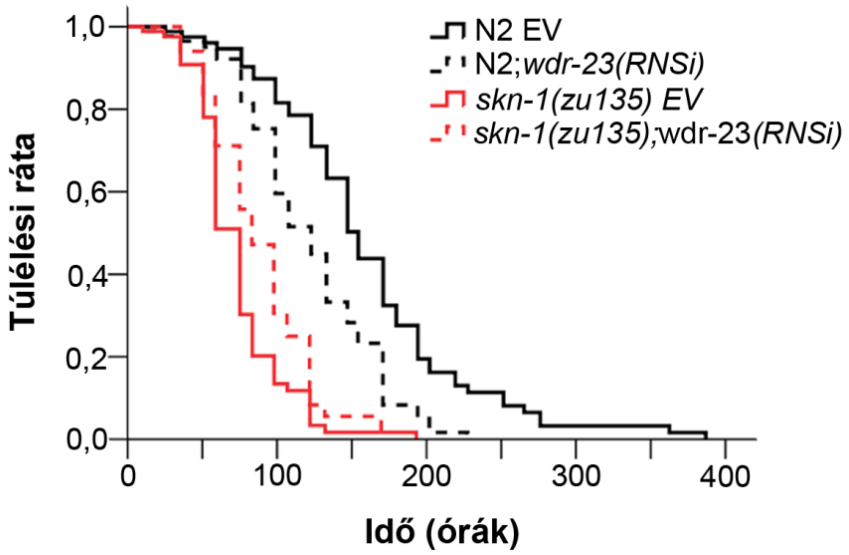


19. ábra A *wdr-23* gén csendesítése robusztus SKN-1 célgén indukciót okoz

Fluoreszcens mikroszkóppal készített reprezentatív felvételek a *wdr-23(RNSi)*-vel kezelt SKN-1 célgén riporter törzsekről. A *Pgcs-1::gfp* és *gst-4::gfp* állatok L3 lárva stádiumig növekedtek *wdr-23* ellen termelt dsRNS-t vagy üres vektort (EV) expresszáló baktériumon. A korábbi *P. aeruginosa* kezeléshez hasonló körülmények megőrzése érdekében az állatok további 24 órán keresztül *E. coli* OP50 baktériumon táplálkoztak.

A *wdr-23(RNSi)* kezelés által kiváltott SKN-1 hiperaktiváció a várttal ellentétben megrövidítette az állatok túlélését *P. aeruginosa* baktériumon ($p<0,0001$, **20. ábra**). A *wdr-23(RNSi)* és EV kezelt *skn-1(zu135)* mutáns állatok túlélése nem tér el

szignifikánsan egymástól, így kizárhatjuk a *wdr-23(RNSi)* kezelés SKN-1-től független hatását a jelenség hátterében (p=0,1992, **20. ábra**).

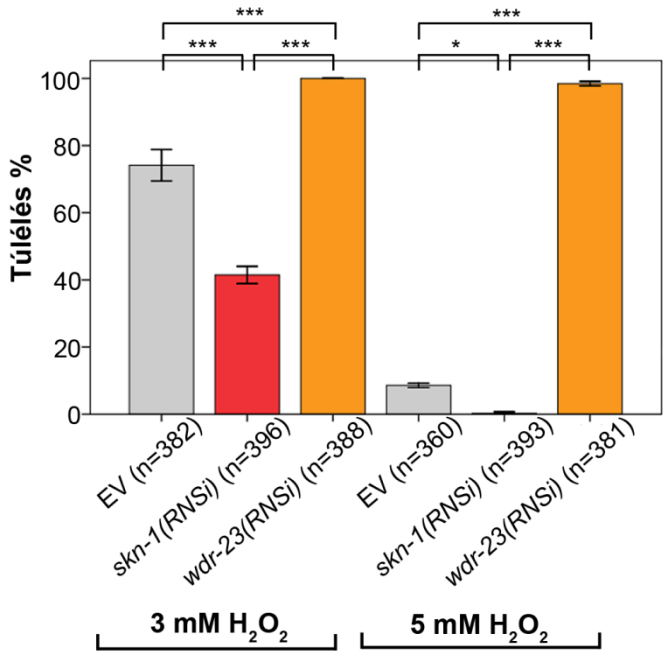


20. ábra SKN-1 hiperaktivációja csökkenti a túlélést *P. aeruginosa* baktériumon

A *wdr-23(RNSi)* kezelt vad típusú N2 és *skn-1(zu135)* mutáns állatok túlélése *P. aeruginosa* PA14 baktériumon. Az N2;*wdr-23(RNSi)* állatok fokozott érzékenységet mutatnak a *P. aeruginosa* baktériummal szemben az üres vektort expresszáló baktériumon (EV) növekedett N2 állatokhoz képest (p<0,0001). Az *skn-1(zu135)* mutáns állatok esetén nincs szignifikáns különbség a *wdr-23(RNSi)*-vel kezelt és a kontroll EV állatok túlélése között PA14 baktériumon (p=0,1992). Megjegyzendő, hogy a **9. ábra** és ezen ábra adatait ugyanazon kísérletek adták.

A *wdr-23(RNSi)* kezelés az irodalmi adatokkal összhangban megnövelte az állatok oxidatív toleranciáját 3 mM és 5 mM H_2O_2-dal szemben (p<0,0001, p<0,0001, **21. ábra**) (Choe és mtsai, 2009). Az *skn-1(RNSi)* állatok oxidatív toleranciája mindkét koncentráció esetén szignifikánsan kisebb volt, mint az üres vektort (EV) expresszáló baktériumon felnőtt állatoké (3 mM H_2O_2 esetén p<0,0001, 5 mM H_2O_2 esetén p<0,05, **21. ábra**).

Az SKN-1 poszttranszlációs stabilizálása *wdr-23(RNSi)* kezeléssel tehát megnöveli az oxidatív toleranciát, viszont csökkenti *P. aeruginosa* baktériummal szembeni ellenállóképességet. Ez arra utal, hogy az SKN-1 eltérő mechanizmussal vesz részt a két folyamat szabályozásában.



21. ábra A *wdr-23(RNSi)* által kiváltott SKN-1 hiperaktiváció megnöveli az oxidatív toleranciát

A *wdr-23(RNSi)* illetve *skn-1(RNSi)* baktériummal kezelt N2 állatok oxidatív toleranciája. 1. napos felnőtt állatokat egy órán keresztül kezeltem 3 mM illetve 5 mM H_2O_2-dal. A túlélők számát 24 órával később jegyeztem fel. A *wdr-23(RNSi)* kezelés szignifikánsan megnövelte ($p<0,0001$), míg az *skn-1(RNSi)* kezelés mindkét koncentráción csökkentette (3 mM H_2O_2 esetén $p<0,0001$, 5 mM H_2O_2 esetén $p<0,05$) az állatok oxidatív toleranciáját az üres vektort expresszáló (EV) RNSi baktériumon felnőtt N2 állatokhoz képest.

5. MEGBESZÉLÉS

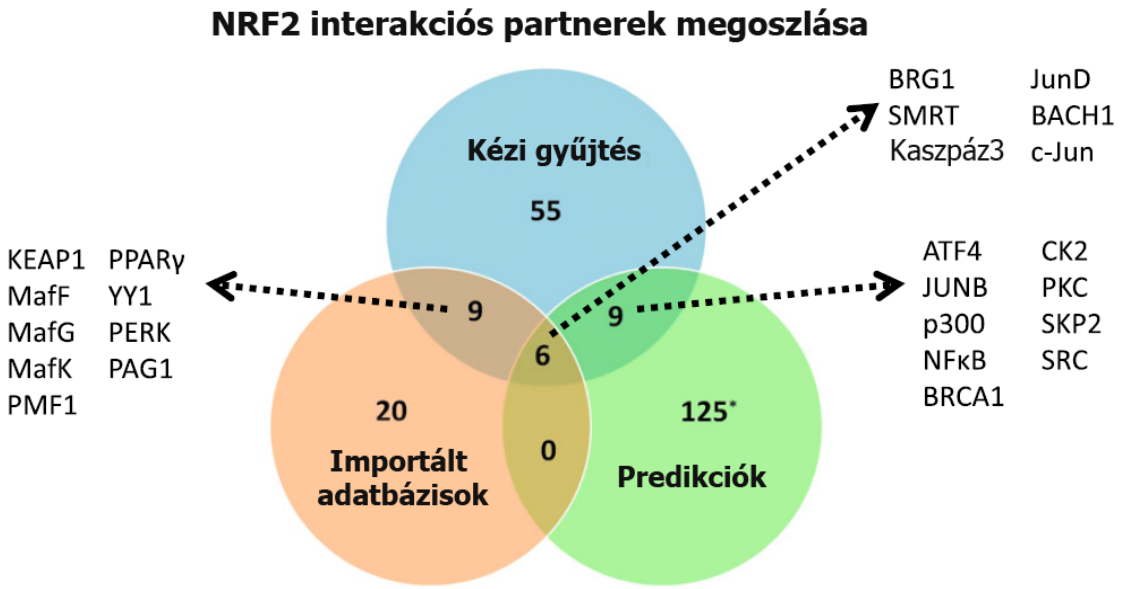
5. 1. Az NRF2 interakciós adatbázisból származó eredmények megbeszélése

Az NRF2 transzkripciós faktor központi szerepet játszik az oxidatív stressz-válasz, illetve a biotranszformáció szabályozásában (Motohashi és Yamamoto, 2004). Az elmúlt két évtizedben további élettani és patológiás folyamatokban mutatták ki az NRF2 érintettségét, pl.: autofágiában, apoptózisban, gyulladásban, karcinogenezisben, obezitásban, neurodegenerációban és krónikus obstruktív tüdőbetegségben (Kensler és mtsai, 2007). Az NRF2 igen intenzíven kutatott fehérje: a PubMed publikáció keresőben több mint 2600 találat szerepel az 'NRF2' kulcsszóra. Ennek ellenére meglepően kevés interakciós partnert (10-20) találhatunk a fehérje-fehérje adatbázisokban (BioGRID, MINT, STRING, HPRD). A doktori munkám során kézi gyűjtéssel létrehoztam az NRF2 interakciós adatbázisát, amely 108 fehérjét és 146 kapcsolatot tartalmaz (**7. ábra**, **Melléklet táblázat**).

Az NRF2 interakciós adatbázist összehasonlítva a fehérje-fehérje adatbázisokkal (BioGRID, MINT, STRING, HPRD) csak kis átfedést találtam, megerősítve a korábbi észrevételt, amely szerint az eddigi adatbázisok számos, már kísérleti úton bizonyított kapcsolatot mellőztek (**22. ábra**). Az ELTE NetBiol Hálózatbiológiai csoportjában Fazekas Dávid által generált domén-domén és domén-motívum alapú predikciók szintén kis átfedést adtak a kézi gyűjtéssel készített NRF2 interakciós adatbázissal, rámutatva további több mint 100 lehetséges NRF2 partnerre. Ezen prediktált kapcsolatok igazolása kísérletes megerősítésre vár a későbbiekben (**22. ábra**). A kézi gyűjtéssel készített NRF2 interakciós adatbázis tehát átfogó, részletes gyűjteménye az NRF2-vel kapcsolatot kialakító fehérjéknek. A teljes NRF2 interakciós adatbázis szabadon elérhető és letölthető az http://nrf2.elte.hu/ oldalon, amely reményeink szerint elősegíti az NRF2 szabályozásának megértését és pl. NRF2-vel kapcsolatos gyógyszercélpontok kijelölését.

A KEAP1 az NRF2 elsődleges negatív regulátora, amely stresszmentes körülmények között az NRF2-t a citoplazmában tartja, megakadályozva annak sejtmagba vándorlását (Zhang, 2006). Mivel a KEAP1 kulcsfontosságú NRF2 partner, az adatbázis építésekor KEAP1 interakciós partnereket is kerestem az NRF2-re alkalmazott protokoll szerint. Meglepő, hogy a 84 NRF2 kapcsolathoz képest csak jóval

kevesebb, 17 KEAP1 kapcsolatot sikerült gyűjteni. Ez az eredmény azt sugallja, hogy az NRF2 több fehérjével képes kapcsolatot kialakítani, illetve több regulátorral rendelkezik. Érdemes viszont megjegyezni, hogy a felderített interakciós partnerek számát befolyásolhatja az adott a fehérje kutatottságának mértéke. A PubMed irodalomkeresőben ugyanis a 'KEAP1' kulcsszóra 611 találat szerepel, amely jóval kevesebb az 'NRF2'-re kapott 2676-hoz képest. A KEAP1 további kutatása tehát újabb partnerek azonosítását és az NRF2 szabályozásának részletesebb megismerését teszi majd lehetővé.



22. ábra Az NRF2 interakciós partnerek vizsgálatához

A venn-diagram megmutatja, hogy a doktori munkám során kézi gyűjtéssel készített NRF2 interakciós adatbázis elemei milyen átfedést adnak az NRF2 interaktómjának létrehozásához felhasznált forrásokkal. Az NRF2 interaktóm két másik forrását az ELTE Hálózatbiológiai csoport munkatársa, Fazekas Dávid hozta létre. A számok az NRF2 interakciós partnerek/kapcsolatok számát jelölik az adott forrásban. Az importált adatbázisok a BioGRID, MINT, IntACT, HPRD és Innate DB adatbázisokat tartalmazzák. A predikciók a domén-motívum és domén-domén interakciók alapján jósolt kapcsolatokat jelölik. A * jelzi, hogy a 125 predikció közül 13-at már leírtak az irodalomban, de a kézi gyűjtés során ezeket nem sikerült megtalálni.

Az NRF2 interakciós adatbázisban 131 irányított kapcsolat szerepel, amelyek 42%-a (55) gátló és 58%-a (76) aktiváló kapcsolat volt. A kapcsolatok molekuláris

mechanizmusának a többsége leucin cipzár alapú heterodimerizáció illetve foszforiláció volt. A heterodimerizáció jelentőségét mutatja, hogy az NRF2 csak (pl. kis Maf fehérjékkel képzett) heterodimer formájában képes a DNS-hez kötődni és célgénjeinek expresszióját aktiválni (Marini és mtsai, 2002). Emellett az NRF2 képes a ZIP doménen keresztül más transzkripciós faktorokkal, pl. c-Jun-nal is heterodimert képezni (Venugopal és mtsai, 1998). Szabályozásának másik fontos eleme a foszforiláció, amely mind az NRF2, mind a KEAP1 működését képes módosítani. Az NRF2 több foszforilációs helyet is tartalmaz, amelyek foszforilációja okozhatja a fehérje aktiválását, pl. a PKCδ által (Niture és mtsai, 2009), és gátlását is, pl. a GSK3β által (Salazar és mtsai, 2006).

Az NRF2 bioinformatikai elemzését Intézetünk LINKGroup és az ELTE Genetikai tanszékén működő NetBiol Hálózatbiológiai csoportjával közösen végeztem. Az általam létrehozott adatbázison, a disszertációban bemutatott funkcionális elemzésen kívül, a két csoport bioinformatikus munkatársai (Módos Dezső, Dúl Zoltán, Türei Dénes, Fazekas Dávid és Korcsmáros Tamás) további elemzéseket is végeztek. Mivel ezekben a vizsgálatokban közvetlenül nem vettem részt, a disszertáció eredmények fejezetében nem kerültek bemutatásra. Az általam készített adatbázis bioinformatikai elemzésével kollégáim azonosítottak több olyan NRF2 által szabályozott transzkripciós faktort, amelyek képesek az NRF2 transzkripcióját vagy transzlációját befolyásolni. Ezen visszacsatolások rámutattak az NRF2 rendszerszintű szabályozására.

Az NRF2 újabb funkcióinak feltárása hozzásegíthet az NRF2 élettani és patológiás folyamatokban betöltött szerepének átfogóbb megismeréséhez. Az NRF2 partnerek GO (*Gene Ontology*) funkciójának elemzése rámutatott arra, hogy a partnerek jelentős része multifunkcionális, több élettani folyamatban is részt vesz (**8. ábra**). Az elemzés nyolc fő funkciót állapított meg, amelyek közül öt biológiai folyamatban a fehérjék jelentős mértékben átfednek. Az öt GO funkció közül négy (jelátvitel, stressz, válasz kémiai stimulusra, anyagcsere) szerepel az NRF2 GO funkciói között (Taguchi és mtsai, 2011), az egyedfejlődés viszont nem. További 3 biológiai folyamatot (immunfolyamatok, sebgyógyulás, szaporodás) azonosítottam, amelyet kevesebb partner funkciói között találtunk meg és kisebb mértékű átfedést is mutattak a többi GO funkcióval. Ezen biológiai folyamatok szintén nem szerepeltek az NRF2 funkciói között.

Annak ellenére, hogy 42 NRF2 partner is rendelkezik egyedfejlődés GO funkcióval, ez nem szerepel az NRF2 funkciói között. Ennek egyik oka lehet, hogy az irodalomban ellentétes eredményeket publikáltak az NRF2 emlősök egyedfejlődésében betöltött szerepéről. Chan és mtsai 1996-ban publikált eredményei szerint az NRF2-nek nincs esszenciális szerepe az egyedfejlődésben (Chan és mtsai, 1996). Ezt az állítást azóta több csoport is megcáfolta, kimutatva az NRF2 szerepét a mezoderma fejlődésében (Farmer és mtsai, 1997), illetve a vörösvértestek képzésében egérben (Chan és mtsai, 1998; Lee és mtsai, 2004). Az utóbbi eredményeket támogatja, hogy *C. elegans*-ban ismert az SKN-1 NRF2 ortológ szerepe a mezoderma és az endoderma kialakulásában (Maduro és mtsai, 2005). Az egyedfejlődés megjelenése az NRF2 partnerek ilyen nagy hányadánál arra utal, hogy az NRF2 részt vesz az egyedfejlődésben. Így javasolt az egyedfejlődés hozzácsatolása az NRF2 GO funkcióihoz, valamint a szomszédok ismeretében további kísérletekkel igazolni az NRF2 szerepét az emlősök egyedfejlődésében.

Az egyedfejlődéshez hasonlóan a szaporodás és az immunfolyamatok sem szerepelnek az NRF2 GO funkciói között, habár mindkét funkció megjelenik az NRF2 interakciós partnereinek jelentős hányadában (19% és 32%). Az NRF2 szaporodásban betöltött szerepét mutatja, hogy szükséges az egér spermatogeneziséhez (Nakamura és mtsai, 2010), míg *C. elegans*-ban a petesejt érésében vesz részt az SKN-1 (Lin, 2003). Ismert továbbá, hogy az NRF2 részt vesz mind az emlősök (Lynn és mtsai, 2010), mind a *C. elegans* természetes immunválaszában, amelyet doktori munkámmal párhuzamosan a Garsin munkacsoport szintén igazolt (Hoeven és mtsai, 2011; Papp és mtsai, 2012a).

Eredményeimet összefoglalva, az NRF2 interakciós partnerek funkcióinak elemzése szélesebb NRF2 részvételt mutat az élettani folyamatokban, amelyekkel érdemes az NRF2 GO funkcióit kiegészíteni, és további kísérletekkel részletesen megvizsgálni.

5.2. Az SKN-1 *C. elegans* immunitásában betöltött szerepét bemutató eredmények megbeszélése

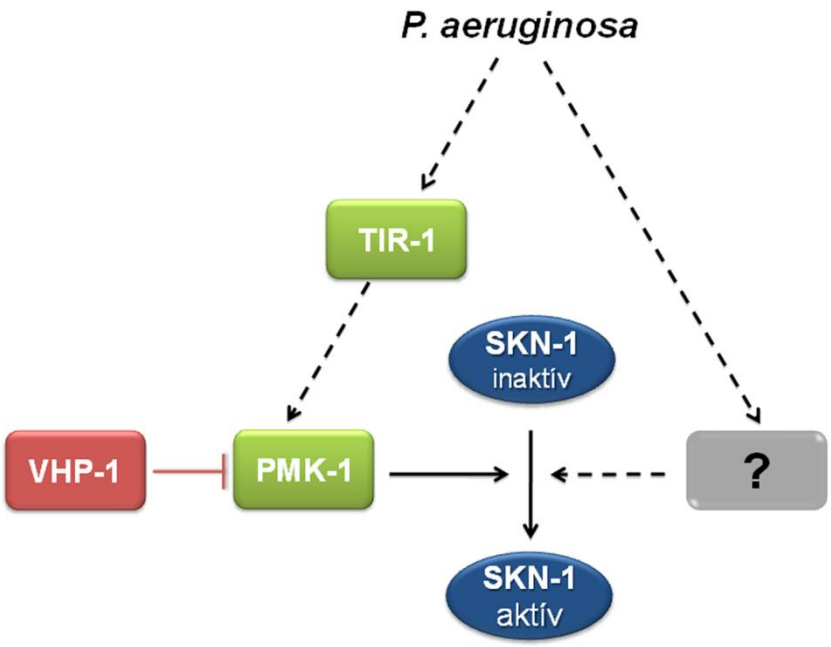
Doktori munkám másik, független részében az NRF2/SKN-1 immunitásban betöltött szerepét vizsgáltam *C. elegans* modellállaton. Vizsgálataimat megelőzően ellentmondó eredményeket publikáltak az irodalomban az SKN-1 és az immunitás kapcsolatáról. Egy 2008-as cikkben Evans és mtsai megjegyzik a diszkusszióban, hogy az *skn-1(RNSi)* kezelés csökkenti az állatok túlélését *P. aeruginosa* baktériumon (Evans és mtsai, 2008b). Az SKN-1 szerepét az immunitásban azonban megcáfolta Shivers és msai 2010-ben publikált munkája, amelyben nem találtak különbséget két *skn-1* mutáns, az *skn-1(zu135)* és az *skn-1(zu67)* illetve a vad típusú N2 állatok túlélése között *P. aeruginosa* baktériumon (Shivers és mtsai, 2010). Igaz eltérő beállítások mellett, de sikerült kimutatnom, hogy SKN-1 hiányában: mind az *skn-1(RNSi)*-vel kezelt, mind az *skn-1(zu135)* mutáns állatok érzékenysége megnő a Gram-negatív *Pseudomonas aeruginosa* és a Gram-pozitív *Enterococcus faecalis* baktériumokkal szemben (**9. ábra**). Az eredményeimet összefoglaló kézirat revíziója közben van der Hoeven és munkatársai hasonló megfigyeléseiket publikálták, megerősítve az SKN-1 szerepét a *C. elegans* immunitásában (Hoeven és mtsai, 2011). Az ellentmondó eredmények hátterében a patogén túlélési tesztek eltérő protokollja állhat. A túlélési tesztekhez használt steril állatokat Evans és mtsai más módszerrel állították elő. A peték kifejlődését a DNS szintézist gátló FUdR (5-fluoro-2′-deoxiuridin) alkalmazásával érték el. Mivel a patogén túlélési tesztekhez használt lemezek tartalmazták a FUdR-t, az hatással lehetett a *P. aeruginosa* patogenitására is. Hasonlóan van der Hoeven és munkatársaihoz (Hoeven és mtsai, 2011), én is *cdc-25.1(RNSi)* kezeléssel, az embrió mitózisához nélkülözhetetlen CDC-25.1 foszfatáz csendesítésével gátoltam meg az utódgeneráció kialakulását. Mivel az állatok sterilizálása még a patogén túlélési teszt előtt történt, ezzel a módszerrel nem változhatott meg az alkalmazott baktérium patogenitása. Az irodalomban nem ismert, de nem zárható ki, hogy a *cdc-25.1(RNSi)* kezelés hatással volt egyes jelátviteli fehérje működésére, és ezeken keresztül módosította az immunválasz folyamatát. Egy nemrég megjelent bioinformatikai elemzés épp erre hívta fel a figyelmet (Farkas és mtsai, 2012).

A *P. aeruginosa* és az *E. faecalis* is a *C. elegans* intesztinális kórokozói, amelyek elleni immunválasz kialakításában a bélhámsejtek vesznek részt. Kimutattam,

hogy az SKN-1 a bélhámsejtekben a sejtmagba vándorol *P. aeruginosa* fertőzés hatására (**10. ábra**). Nem találtam különbséget az ASI neuronokban expresszálódó SKN-1::GFP intenzitásában a *P. aeruginosa* és nem patogén *E. coli* OP50 baktériumon inkubált állatok között. Ez a megfigyelés összhangban áll korábbi eredményekkel, amelyben az ASI neuronokban expresszálódó SKN-1B izoforma állandó sejtmagi lokalizációját figyelték meg stresszmentes körülmények között (Bishop és mtsai, 2007). Choe és mtsai nem detektáltak élesztő kettős hibrid technikával kölcsönhatást az SKN-1B és a WDR-23 között, amely arra utal, hogy az SKN-1B izoforma nem áll proteaszomális szabályozás alatt (Choe és mtsai, 2009). Az SKN-1B izoforma szerepének tisztázása az immunválaszban további kutatást igényel, amely izgalmas eredményekkel szolgálhat az immunválasz idegi szabályozásáról.

P. aeruginosa fertőzés hatására bekövetkező SKN-1 aktivációt két célgénjének, a *gcs-1*-nek és a *gst-4*-nek megnőtt expressziójával mutattam be (**11. ábra**). A két riporter, a *Pgcs-1::*GFP és a GST-4::GFP intesztinális expressziója arra utal, hogy az immunválaszban elsősorban az SKN-1C izoforma vesz részt, amelyről korábban kimutatták, hogy fontos regulátora az oxidatív stresszválasznak (Bishop és mtsai, 2007).

Emlősökben az NRF2 elsődleges regulátora a KEAP1 fehérje, amelynek ortológja vagy hozzá hasonló funkciót betöltő fehérje nem ismert *C. elegans*-ban. Az SKN-1 aktivitását elsősorban kinázok szabályozzák, amelyek foszforiláció révén gátolják vagy elősegítik az SKN-1 proteaszomális lebontását (An és mtsai, 2005; Inoue és mtsai, 2005; Kell és mtsai, 2007). van der Hoeven és mtsai eredményeivel összhangban kimutattam, hogy a p38 MAPK ortológ PMK-1 szükséges az SKN-1 aktivációjához *P. aeruginosa* fertőzés során (Hoeven és mtsai, 2011) (**12.** és **23. ábra**). Habár a PMK-1 inhibítor VHP-1 foszfatáz csendesítése megnövelte az SKN-1 aktivációját *P. aeruginosa* fertőzés során, önmagában nem indukálta a *gcs-1* promóter indukcióját a nem patogén *E. coli* OP50 baktériumon (**12. ábra**). Ez az eredmény az SKN-1 PMK-1-től független, további szabályozására utal, amelynek feltárása segít megérteni az SKN-1 aktiválódásának hatásmechanizmusát, így közvetetten az immunválaszban játszott szerepét. Érdemes megjegyezni, hogy van der Hoeven és munkatársai modelljében a PMK-1-et az immunválasz során, a BLI-3 által termelt ROS aktiválja, viszont PMK-1 független szabályozás létére utaló adatot ez a kutatócsoport nem publikált (Hoeven és mtsai, 2011).



23. ábra A *P. aeruginosa* fertőzés hatására bekövetkező SKN-1 aktiváció modellje
Az SKN-1 aktivációjához szükség van a TIR-1/PMK-1 immunspecifikus jelátvitelre, amelyet patogénmentes környezetben gátol a VHP-1 foszfatáz. E mellett viszont további faktorok vehetnek részt az SKN-1 aktivációjában, pl: a patogén baktérium oxidatív toxinjai és/vagy a bélhámsejtek által termelt reaktív oxigéngyökök által kialakított oxidatív környezet a bél lumenében, de valamilyen jelpálya szerepe sem kizárt.

Az SKN-1 aktivációjában résztvevő regulátorok további vizsgálatában sikerült egy új, immunspecifikus *upstream* komponenst azonosítani az útvonalban, a TIR-1-et (**23. ábra**). Az emlős SARM fehérjével homológ (Carty és mtsai, 2006) TIR-1 (Toll/Interleukin-1 rezisztencia domén fehérje) fehérje funkciója feltehetően az információ továbbítása egy patogént felismerő receptor és a p38 MAPK útvonal között (Couillault és mtsai, 2004; Liberati és mtsai, 2004). TIR-1 hiányában elmaradt az SKN-1 nukleáris lokalizációja és célgén aktivációja *P. aeruginosa* fertőzés során (**12.** és **13. ábra**). Az SKN-1 TIR-1 általi aktivációja arra utal, hogy az SKN-1 közvetlenül az immun-jelátvitel felől is kap aktivációs jelet, amely tovább növelheti az SKN-1 aktiváció sikerét. van der Hoeven és munkatársai *E. faecalis* fertőzés során nem mutattak ki TIR-1-függő SKN-1 aktivációt (Hoeven és mtsai, 2011). A két labor által kapott ellentmondó eredmények származhatnak a különböző patogének alkalmazásából, vagy az eltérő protokollokból, pl. a *tir-1(RNSi)* dózisának különbségéből. A TIR-1 SKN-1 aktivációjában betöltött szerepe így további tisztázást igényel.

Az öregedő nyugati társadalmak egyik megoldásra váró problémája az immunszeneszcencia és annak egészségügyi-gazdasági következményei. Idős korban csökken az immunválasz hatékonysága, amely érzékenyebbé teszi a szervezetet a kórokozókkal szemben (Aw és mtsai, 2007). A *C. elegans* fonálféreg kedvező tulajdonságai miatt (rövid élethossz) megfelelő modellállata lehet az öregedés természetes immunitásra gyakorolt hatásának vizsgálatára (Alper, 2010). Youngman és mtsai átfogó tanulmányt közöltek a *C. elegans* immunszeneszcenciájáról, amelyben a 6. napos felnőtt kor után jelentős csökkenést mutattak ki az állatok ellenállóképességében *P. aeruginosa* baktérium ellen (Youngman és mtsai, 2011). Kísérleteimben a patogén rezisztencia fiatalabb korban bekövetkező visszaesését figyeltem meg: a 4. napos felnőtt állatoknak 45%-kal rövidebb volt a túlélése *P. aeruginosa* PA14 baktériumon, mint az első napos felnőtteké (**16. ábra**). Az SKN-1 hiánya az első napos felnőtt állatok túlélését a 4. napos vad típusú állatokéhoz teszi hasonlóvá, amely különbség fennmarad a 9. napos felnőtt állatok esetén is (**16. ábra**). Ezzel párhuzamosan erőteljes visszaesést figyeltem meg az SKN-1 célgén, *gcs-1* promóter aktivációjában a 4. és 9. napos felnőtt állatokban (**14. ábra**). Azonosítottam további 30 PA14 által szabályozott SKN-1 célgént, amelyek expressziója drasztikusan csökken öregedés során (6. és a 15. napos felnőtt kor között) (**15. ábra**). A fenti eredmények azt mutatják, hogy az SKN-1 funkciójának visszaesése fontos eleme lehet az immunszeneszcencia kialakulásának. Youngman és munkatársai a PMK-1 aktivitásának csökkenését és a bél szöveti leépülését jelölték meg az immunszeneszcencia fő okaiként (Youngman és mtsai, 2011). Megjegyzendő, hogy az SKN-1 aktivációjának PMK-1 függése ((Hoeven és mtsai, 2011) és saját eredmény), az SKN-1 célgének nagy aránya az öregedés-függő PMK-1 targetek között (13 db a 26-ból) (**15. ábra**) (Youngman és mtsai, 2011), valamint az SKN-1 szerepe a bél homeosztázisában (Park és mtsai, 2009) arra utalnak, hogy az SKN-1 és a PMK-1 között dinamikus kölcsönhatás van az immunszeneszcencia kialakulása során.

Az NRF2 mérsékli a gyulladás által okozott szöveti károsodást emlősökben (Harvey és mtsai, 2011; Kim és mtsai, 2009; Nagai és mtsai, 2009; Thimmulappa és mtsai, 2006). *C. elegans*-ban az SKN-1 részt vesz a megfelelő élethossz kialakításában (Tullet és mtsai, 2008) és a bél homeosztázisának megőrzésében (Park és mtsai, 2009), így felmerül a kérdés, hogy az SKN-1 immunitásban betöltött szerepe független-e az

élethossz szabályozásában betöltött szerepétől. Ez a kérdés rendkívül összetett, hiszen *C. elegans*-ban a stresszadaptáció, az immunitás és az élethossz egymással szoros kölcsönhatásban álló folyamatok. Az *skn-1(zu135)* mutánsok élethosszának csökkenése a vad típusú állatokhoz képest *P. aeruginosa* PA14 baktériumon nagyobb, mint a nem patogén *E. coli* OP50 baktériumon (51% vs. 19%, **9. ábra**) (Papp és mtsai, 2012a), ami arra utal, hogy az SKN-1 nagyobb hatással van az immunitásra, mint az élethossz szabályozására . Emellett a megfigyelt patogén indukálta SKN-1 aktiváció (**10.** és **11. ábra**) és az SKN-1 célgének között a PA14 által szabályozott, pl. CUB-szerű doménnel rendelkező antimikrobiális fehérjék nagy aránya (Oliveira és mtsai, 2009) azt mutatja, hogy az SKN-1 aktívan részt vesz az antibakteriális válaszban. Ezen eredményeket támasztja alá, hogy az *skn-1(RNSi)* szelektíven szuppresszálja a *daf-2(e1370)* állatok stresszrezisztenciáját, míg megnövekedett élethosszát nem (Tullet és mtsai, 2008). Kimutattam, hogy a *daf-2(e1370)* állatok megnövekedett patogén rezisztenciája SKN-1-függő (**17. ábra**), igazolva ezzel az SKN-1 immunspecifikus hatását. Az SKN-1 célgénjeinek további vizsgálata feltárhatja, mely gének járulnak hozzá a megfelelő élethossz és melyek az immunválasz kialakításához.

Számos genetikai és környezeti hatás ismert, amely stresszreszponzív védelmi mechanizmusokra hatva megnöveli az élethosszt, és a patogénekkel szembeni ellenállóképességet (Cypser és mtsai, 2002; Garsin és mtsai, 2003; Kenyon és mtsai, 1993; Singh és Aballay, 2006b). Elsőként sikerült kimutatni, hogy az állatokat felnőtt korban ért enyhe oxidatív stresszhatás képes megnövelni azok patogén rezisztenciáját (**18. ábra**), hasonlóan Singh és Aballay eredményeihez, akik hőstresszel váltottak ki ellenállóképesség-növekedést (Singh és mtsai, 2006b). Az oxidatív előkezelés hatására megemelkedett ellenállóképesség kialakításában két antioxidáns transzkripciós faktor: az SKN-1 és a DAF-16/FOXO vesz részt, ugyanúgy, mint a *daf-2(e1370)* mutánsok megnőtt élethosszának kialakításában. Ez arra utalhat, hogy dinamikus kapcsolat van a különböző stresszválaszok transzkripciós faktorai között, amelyek folyamatosan egyensúlyoznak a környezeti/genetikai igényeknek megfelelően az adott válaszreakció meghatározásakor. Habár az eredményeim nem adnak közvetlen bizonyítékot az SKN-1 DAF-16-függő szabályozására, Schuster és munkatársai nagy áteresztőképességű DamID technikával azonosították az SKN-1-et a DAF-16 célgénjei között (Schuster és

mtsai, 2010). A két transzkripciós faktor közötti kapcsolat feltárása hozzásegíthet a stresszválasz és az élethossz szabályozás mélyebb megértéséhez.

Az SKN-1 stabilizációja *wdr-23(RNSi)* által megnöveli az élethosszt és az oxidatív stressztoleranciát (Choe és mtsai, 2009). A van der Hoeven és munkatársai által kapott eredményeknek (Hoeven és mtsai, 2011) ellentmondva kísérleteimben a *wdr-23(RNSi)* kezelés csökkentette az állatok túlélését *P. aeruginosa* PA14 baktériumon (**20. ábra**). A két kutatócsoport által kapott eltérő eredmény hátterében a *cdc-25.1(RNSi)* alkalmazása állhat. Ugyanis van der Hoeven és munkatársai ebben az esetben *cdc-25.1(RNSi)* kezelés nélkül végezték el a teszteket, így felmerül a '*bag of worms*' fenotípus eredményeket módosító hatása. Sajnos a publikációból nem derül ki, hogy a *wdr-23(RNSi)* kezelés volt-e hatással a fertőzés indukálta '*bag of worms*' fenotípusra vad típusú állatokban. Az eredményeket emellett befolyásolhatta a két labor által alkalmazott protokollok további különbségei, pl. a *wdr-23(RNSi)* baktérium dózisa is. A *wdr-23(RNSi)* által kiváltott SKN-1 hiperaktiváció káros hatásához hasonlót korábban is tapasztaltak a magas kópiaszámú extrakromoszomális SKN-1-et tartalmazó transzgének esetén (Tullet és mtsai, 2008). A *wdr-23(RNSi)* kezelés nem általánosan fejt ki káros hatást az állatokra, hiszen megismételve Choe és munkatársai eredményeit (Choe és mtsai, 2009), a *wdr-23(RNSi)* kezelés jelentősen megnövelte az állatok oxidatív toleranciáját (**21. ábra**). Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy az SKN-1 eltérő mechanizmussal vesz részt az immunválaszban és az oxidatív stresszválaszban. Elképzelhető, hogy az SKN-1 stabilizációja átrendezi az SKN-1 által aktivált célgének profilját, amely kedvezően hat az akut oxidatív stresszválaszra, de hátrányos a hosszan tartó *P. aeruginosa* fertőzés elleni védekezés során. Ezt támasztja alá, hogy az SKN-1 valóban képes különböző célgén profilok transzkripciójának aktivációjára eltérő körülmények között (Oliveira és mtsai, 2009). Megfigyelték, hogy az SKN-1-hez hasonlóan a DAF-16 hiperaktivációja is csökkenti az állatok ellenállóképességét patogén baktériumokkal szemben (Singh és Aballay, 2009), amely arra utal, hogy a *C. elegans* immunválasza során rendkívül fontos az egyes válaszreakciók precíz szabályozása.

Összefoglalva, az SKN-1 aktivitás megfelelő mértékű fokozása megnövelheti az immunitást és késleltetheti az immunszeneszcencia kialakulását. Az utóbbi években a *C. elegans* új modellállata lett nemcsak a természetes immunitás, a gazda-patogén

kölcsönhatások, de a gyógyszerkutatásnak is (Ewbank és mtsai, 2011). Így eredményeim hozzájárulhatnak a természetes immunitást befolyásoló SKN-1/NRF2 aktivitást moduláló gyógyszerek fejlesztéséhez.

6. KÖVETKEZTETÉSEK

Doktori munkám első részében az NRF2 interakciós partnereinek bioinformatikai elemzésével foglalkoztam. Kézi gyűjtéssel létrehoztam az NRF2 interakciós adatbázist, amely a korábbi fehérje-fehérje adatbázisokhoz képest egy nagyságrenddel több fehérjét (10-20 helyett 108 fehérjét) tartalmaz, ebből adódóan értékes forrásként szolgálhat az NRF2-vel foglalkozó kutatók számára. Az NRF2 számos, a társadalom széles rétegét érintő betegség elleni védekezésben vesz részt, pl. daganatos illetve neurodegeneratív betegségek, stb. (**1. táblázat**). Az NRF2 központi szerepe miatt valószínűleg kevésbé alkalmas gyógyszer célpontnak. A létrehozott adatbázis azonban segíthet az NRF2 partnerek között a megfelelő targetek kiválasztásában, amelyek módosítása a kívánt NRF2 aktivitást/gátlást eredményezi.

Az NRF2 elsősorban az oxidatív stresszválasz és biotranszformáció szabályozásában betöltött szerepéről ismert. Interakciós partnereinek funkcióvizsgálata viszont az NRF2 ennél sokkal összetettebb szerepét mutatja a különböző élettani folyamatokban. Az analízis előrejelezte az NRF2 részvételét pl. egyedfejlődésben, szaporodásban és immunfolyamatokban is, amely funkciók nem szerepelnek az NRF2 annotált funkciói között. Emlősökben már ismert az NRF2 szerepe ezen folyamatokban, melyek közül az immunitásban játszott, az evolúció során korán feltűnt kulcsszerepét *C. elegans*-on végzett vizsgálataim is megerősítettek. Az NRF2 funkcióinak és interakciós partnereinek felderítése rámutatott az NRF2 transzkripciós faktor központi szerepére számos biológiai folyamatban, így módosítása pl. gyógyszertervezés esetén precíz szakértelmet igényel. A létrehozott adatbázis és elvégzett funkcionális elemzés az eddigi hiányosságokat hívatott pótolni, új ötleteket és lehetőséget felvetve az NRF2-vel és érintett folyamataival foglalkozó kutató számára.

A doktori munkám második részében az NRF2/SKN-1 immunitásban betöltött szerepével foglalkoztam *Caenorhabditis elegans*-ban. A *C. elegans* fonálféreg kiváló modellként szolgál a természetes immunitás konzervált, ősi mechanizmusainak tanulmányozásához, amelyre a későbbiekben a komplex, adaptív immunválasz épül. Bakteriális fertőzés során a *C. elegans* bél lumenében kialakuló környezet megfelelően modellezheti a természetes immunsejteket körülvevő környezetet immunválasz során. A bélhámsejtekben immunválasz során bekövetkező SKN-1 aktiváció felveti annak a

lehetőségét, hogy emlősökben is talán szerepe lehet az NRF2-nek a fertőzésekkel szembeni védettség kialakításában. Habár az SKN-1 és az NRF2 szabályozásában levő különbségek miatt nem feleltethető meg teljes mértékben a *C. elegans*-ban kapott eredmények az emlősökben történő aktivációhoz, azonban megerősítik az NRF2/SKN-1 konzervált szerepét a természetes immunitásban. Ennek részletesebb feltárása, pl. a SARM/p38 MAPK útvonal általi NRF2 szabályozás emlősökben még tesztelésre vár.

Több stresszválaszban jelentős transzkripciós faktor, pl. HSF-1, DAF-16 esetén is ismert aktivitásuk csökkenése öregedés során. Az SKN-1 hasonlóan csökkenő hatékonysággal képes aktiválni célgénjeit immunválasz során az életkor előrehaladtával. A stresszválasz megfelelő működése, az immunsejtek homeosztázisának megőrzése elengedhetetlen a kórokozókkal szembeni védekezés során. Feltehetően az SKN-1 mellett további transzkripciós faktorok, jelátviteli fehérjék csökkent hatékonysága is hozzájárul az immunszeneszcencia kialakulásához, amelynek felderítése hozzájárulhat a jelenség megértéséhez, majd kezeléséhez. Mivel emlősökben nem ismert az NRF2 szerepe az immunszeneszcenciában, eredményeim új irányt nyithatnak a területen.

Enyhe stresszhatás ellenállóbbá tesz az erősebb stresszhatásokkal szemben. Kimutattam, hogy az enyhe oxidatív kezelés megnöveli a *C. elegans* fonálférgek ellenállóképességét a *P. aeruginosa* fertőzésessel szemben. A megnövekedett ellenállóképességhez szükség van az SKN-1 mellett DAF-16-ra is, amely utalhat a két antioxidáns transzkripciós faktor kooperatív működésére. Ezt támasztja alá, hogy az inzulin/IGF receptor hiányában kialakult megnövekedett élethosszhoz és patogén rezisztenciához is szükség van mindkét fehérjére. A stresszválaszban résztvevő transzkripciós faktorok közötti kapcsolatok feltárása szintén izgalmas eredményekkel szolgálhat az öregedés- és stresszkutatás számára.

Az SKN-1 hiperaktivációja előnyös az erős oxidatív stresszel szemben, viszont káros a hosszan tartó bakteriális fertőzés esetén. Az SKN-1 feltehetően eltérő mechanizmussal vesz részt a két biológiai folyamatban: más célgéneket indukál oxidatív stressz- és immunválasz során. Amennyiben az NRF2 működése is hasonló, gyógyszertervezéskor nem elegendő az NRF2 fokozott aktivációját megcélozni, hanem a megfelelő NRF2 célgén profilt kell elérni. Annak vizsgálata, hogy egy adott szabályozás mellett milyen NRF2 célgén profilok aktiválódnak elősegíthetik a megfelelő gyógyszer célpontok meghatározását.

Doktori munkámban tehát bemutattam, hogy a bioinformatikai eszközök és a *C. elegans*-on végzett kísérletek együttes alkalmazása elősegíthetik az emlősökben is fontos transzkripciós faktor, az NRF2 szerepének felderítését az immunválaszban.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Az NRF2/SKN-1 transzkripciós faktor az oxidatív és xenobiotikus stresszválasz mesterregulátora. Doktori munkám során kézi gyűjtéssel létrehoztam az emlős NRF2 interakciós partnereit tartalmazó adatbázist, amely korábbi fehérje-fehérje adatbázisokhoz képest egy nagyságrenddel több NRF2 partnert tartalmaz. Az NRF2 partnerek jelentős része multifunkcionális fehérjének bizonyult, amelyek 8 fő biológiai folyamatba sorolhatók. Ezek közül 4 nem szerepel a bioinformatikai adatbázisokban eddig listázott NRF2 funkciók között: egyedfejlődés, szaporodás, immunfolyamatok és sebgyógyulás. A bioinformatikai analízissel kapott predikciókat támasztja alá, hogy emlősökben és *C. elegans*-ban már kimutatták ezen folyamatokban az NRF2 szerepét.

Kísérleti munkámat *Caenorhabditis elegans* fonálférgen folytattam, amely az utóbbi két évtizedben a természetes immunitás tanulmányozásának egyik új modellállatává vált. Kimutattam, hogy az SKN-1 szükséges a *Pseudomonas aeruginosa* és az *Enterococcus faecalis* elleni megfelelő immunitás kialakításához. Megfigyeltem továbbá, hogy a bélhámsejtekben az SKN-1 felhalmozódik a sejtmagban, és aktiválja két célgénjének, a *gcs-1*-nek és *gst-4*-nek expresszióját *P. aeruginosa* fertőzés hatására. Azonosítottam az SKN-1 aktiválásához nélkülözhetetlen jelátviteli út két tagját, a PMK-1/p38 MAPK és a TIR-1/SARM fehérjéket. Kimutattam, hogy öregedés során csökken a *P. aeruginosa* által indukált SKN-1 célgén aktiváció, amelyet megerősített korábbi *microarray* vizsgálatok analízise. Ezek az eredmények és az SKN-1 hiányában megfigyelhető csökkent patogénrezisztencia arra utal, hogy az SKN-1 csökkent működése hozzájárulhat az immunszeneszcencia kialakulásához *C. elegans*-ban. Inzulin/IGF receptor hiánya illetve az állatok oxidatív előkezelése megnöveli, az állatok túlélését *P. aeruginosa* baktériumon. Kimutattam, hogy mindkét hatás kialakításához szükség van az SKN-1-re, amely az SKN-1 alapvető szerepét mutatja a *C. elegans* természetes immunitásában. Az SKN-1 hiperaktivációja megnövelte az állatok oxidatív stressztűrését, viszont csökkentette patogén rezisztenciáját, amely arra utal, hogy az SKN-1 eltérő mechanizmussal vesz részt a két folyamatban.

Összefoglalva, doktori munkám során vizsgáltam az NRF2 interakciós partnereit, illetve *C. elegans* ortológjának szerepét a természetes immunitásban. Eredményeim újabb kapcsolatot teremtenek az oxidatív-xenobiotikus stresszválasz, az öregedés és az immunitás között.

8. SUMMARY

The NRF2/SKN-1 transcription factor is a master regulator of the oxidative-xenobiotic stress response. During my Ph.D. studies, I created a manually curated NRF2-protein interaction database. This database involves 108 NRF2-interacting proteins, which is an order of magnitude higher than deposited interactions in the current web resources. Analysis of the interactors showed that most of them are multifunctional and can be grouped into 8 major biological functions. Half of the these functions were not found among the functions of NRF2 in bioinformatics sources: development, reproduction, immunity and wound repair. The predictions of my bioinformatic analysis was confirmed by previous studies, in which the role of NRF2 was demonstrated in these processes in mammals and *Caenorhabditis elegans*.

My experimental investigations on NRF2/SKN-1 in immunity was carried out in the nematode *C. elegans*, which became a new model organism of innate immunity in the last decades. I showed that SKN-1 is required for pathogen resistance against *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterococcus faecalis*. Accumulation of SKN-1 in intestinal nuclei and induction of SKN-1 target genes (*gcs-1, gst-4*) was observed in response to *P. aeruginosa*. SKN-1 was activated via the PMK-1/TIR-1 signaling pathway upon *P. aeruginosa* infection. I also demonstrated that SKN-1 target gene induction was decreased in aged worms, which was confirmed by bioinformatic analysis of published microarray databases. These results together with an impaired immunity in the absence of SKN-1 demonstrates that SKN-1 contributes to immunosenescence in *C. elegans*. SKN-1 was required for the increased pathogen resistance against *P. aeruginosa* of insulin/IGF receptor null mutant and oxidatively preconditioned animals. These results suggest that SKN-1 plays a fundamental role in *C. elegans* immunity. Hyper-activation of SKN-1 enhanced oxidative tolerance, while compromised pathogen resistance, which suggests that SKN-1 may act in these processes *via* different mechanisms, e.g. by activation of specific target gene profiles.

In summary, I investigated the interactors of NRF2 and the role of its ortholog in *C. elegans* immunity by using both bioinformatics and experimental approaches, which created a new cross-talk between oxidative stress, aging and immunity.

9. IRODALOMJEGYZÉK

Agarwal S., Busse P. J. (2010) Innate and adaptive immunosenescence. *Ann Allergy Asthma Immunol* **104:** 183-190; quiz 190-182, 210.

Aleksunes L. M., Manautou J. E. (2007) Emerging role of Nrf2 in protecting against hepatic and gastrointestinal disease. *Toxicol Pathol* **35:** 459-473.

Alper S. (2010) Model systems to the rescue: The relationship between aging and innate immunity. *Commun Integr Biol* **3:** 409-414.

Alper S., McBride S. J., Lackford B., Freedman J. H., Schwartz D. A. (2007) Specificity and complexity of the *Caenorhabditis elegans* innate immune response. *Mol Cell Biol* **27:** 5544-5553.

An J. H., Blackwell T. K. (2003) SKN-1 links *C. elegans* mesendodermal specification to a conserved oxidative stress response. *Genes Dev* **17:** 1882-1893.

An J. H., Vranas K., Lucke M., Inoue H., Hisamoto N., Matsumoto K., Blackwell T. K. (2005) Regulation of the *Caenorhabditis elegans* oxidative stress defense protein SKN-1 by glycogen synthase kinase-3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102:** 16275-16280.

Araujo J. A., Zhang M., Yin F. (2012) Heme oxygenase-1, oxidation, inflammation, and atherosclerosis. *Front Pharmacol* **3:** 119.

Aw D., Silva A. B., Palmer D. B. (2007) Immunosenescence: emerging challenges for an ageing population. *Immunology* **120:** 435-446.

Bishop N. A., Guarente L. (2007) Two neurons mediate diet-restriction-induced longevity in *C. elegans*. *Nature* **447:** 545-549.

Blackwell T. K., Bowerman B., Priess J. R., Weintraub H. (1994) Formation of a monomeric DNA binding domain by Skn-1 bZIP and homeodomain elements. *Science* **266:** 621-628.

Bolm M., Jansen W. T., Schnabel R., Chhatwal G. S. (2004) Hydrogen peroxide-mediated killing of *Caenorhabditis elegans*: a common feature of different streptococcal species. *Infect Immun* **72:** 1192-1194.

Bolz D. D., Tenor J. L., Aballay A. (2010) A conserved PMK-1/p38 MAPK is required in *C. elegans* tissue-specific immune response to *Y. pestis* infection. *J Biol Chem* **285:** 10832-10840.

Bowerman B., Eaton B. A., Priess J. R. (1992) skn-1, a maternally expressed gene required to specify the fate of ventral blastomeres in the early *C. elegans* embryo. *Cell* **68:** 1061-1075.

Boyle E. I., Weng S., Gollub J., Jin H., Botstein D., Cherry J. M., Sherlock G. (2004) GO::TermFinder--open source software for accessing Gene Ontology information and finding significantly enriched Gene Ontology terms associated with a list of genes. *Bioinformatics* **20:** 3710-3715.

Brenner S. (1974) The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **77:** 71-94.

Brouillet E., Conde F., Beal M. F., Hantraye P. (1999) Replicating Huntington's disease phenotype in experimental animals. *Prog Neurobiol* **59:** 427-468.

Calkins M. J., Johnson D. A., Townsend J. A., Vargas M. R., Dowell J. A., Williamson T. P., Kraft A. D., Lee J. M., Li J., Johnson J. A. (2009) The Nrf2/ARE pathway as a potential therapeutic target in neurodegenerative disease. *Antioxid Redox Signal* **11:** 497-508.

Carty M., Goodbody R., Schroder M., Stack J., Moynagh P. N., Bowie A. G. (2006) The human adaptor SARM negatively regulates adaptor protein TRIF-dependent Toll-like receptor signaling. *Nat Immunol* **7:** 1074-1081.

Chalfie M., Tu Y., Euskirchen G., Ward W. W., Prasher D. C. (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263:** 802-805.

Chan J. Y., Kwong M., Lu R., Chang J., Wang B., Yen T. S., Kan Y. W. (1998) Targeted disruption of the ubiquitous CNC-bZIP transcription factor, Nrf-1, results in anemia and embryonic lethality in mice. *EMBO J* **17:** 1779-1787.

Chan K., Kan Y. W. (1999) Nrf2 is essential for protection against acute pulmonary injury in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96:** 12731-12736.

Chan K., Lu R., Chang J. C., Kan Y. W. (1996) NRF2, a member of the NFE2 family of transcription factors, is not essential for murine erythropoiesis, growth, and development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93:** 13943-13948.

Chavez V., Mohri-Shiomi A., Garsin D. A. (2009) Ce-Duox1/BLI-3 generates reactive oxygen species as a protective innate immune mechanism in *Caenorhabditis elegans*. *Infect Immun* **77:** 4983-4989.

Chavez V., Mohri-Shiomi A., Maadani A., Vega L. A., Garsin D. A. (2007) Oxidative stress enzymes are required for DAF-16-mediated immunity due to generation of reactive oxygen species by *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **176:** 1567-1577.

Cho H. Y., Imani F., Miller-DeGraff L., Walters D., Melendi G. A., Yamamoto M., Polack F. P., Kleeberger S. R. (2009) Antiviral activity of Nrf2 in a murine model of respiratory syncytial virus disease. *Am J Respir Crit Care Med* **179:** 138-150.

Cho H. Y., Reddy S. P., Yamamoto M., Kleeberger S. R. (2004) The transcription factor NRF2 protects against pulmonary fibrosis. *FASEB J* **18:** 1258-1260.

Choe K. P., Przybysz A. J., Strange K. (2009) The WD40 repeat protein WDR-23 functions with the CUL4/DDB1 ubiquitin ligase to regulate nuclear abundance and activity of SKN-1 in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Cell Biol* **29:** 2704-2715.

Church D. F., Pryor W. A. (1985) Free-radical chemistry of cigarette smoke and its toxicological implications. *Environ Health Perspect* **64:** 111-126.

Comandini A., Marzano V., Curradi G., Federici G., Urbani A., Saltini C. (2010) Markers of anti-oxidant response in tobacco smoke exposed subjects: a data-mining review. *Pulm Pharmacol Ther* **23:** 482-492.

Couillault C., Pujol N., Reboul J., Sabatier L., Guichou J. F., Kohara Y., Ewbank J. J. (2004) TLR-independent control of innate immunity in *Caenorhabditis elegans* by the TIR domain adaptor protein TIR-1, an ortholog of human SARM. *Nat Immunol* **5:** 488-494.

Cypser J. R., Johnson T. E. (2002) Multiple stressors in *Caenorhabditis elegans* induce stress hormesis and extended longevity. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **57:** B109-114.

Darby C. (2005) Interactions with microbial pathogens. *WormBook***:** 1-15.

Dhakshinamoorthy S., Porter A. G. (2004) Nitric oxide-induced transcriptional up-regulation of protective genes by Nrf2 via the antioxidant response element counteracts apoptosis of neuroblastoma cells. *J Biol Chem* **279:** 20096-20107.

Evans E. A., Chen W. C., Tan M. W. (2008a) The DAF-2 Insulin-like Signaling Pathway Independently Regulates Aging and Immunity in *C. elegans*. *Aging Cell*.

Evans E. A., Kawli T., Tan M. W. (2008b) Pseudomonas aeruginosa suppresses host immunity by activating the DAF-2 insulin-like signaling pathway in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Pathog* **4:** e1000175.

Ewbank J. J. (2006) Signaling in the immune response. *WormBook***:** 1-12.

Ewbank J. J., Zugasti O. (2011) C. elegans: model host and tool for antimicrobial drug discovery. *Dis Model Mech* **4:** 300-304.

Farkas I. J., Szanto-Varnagy A., Korcsmaros T. (2012) Linking proteins to signaling pathways for experiment design and evaluation. *PLoS One* **7:** e36202.

Farmer S. C., Sun C. W., Winnier G. E., Hogan B. L., Townes T. M. (1997) The bZIP transcription factor LCR-F1 is essential for mesoderm formation in mouse development. *Genes Dev* **11:** 786-798.

Fire A., Xu S., Montgomery M. K., Kostas S. A., Driver S. E., Mello C. C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391:** 806-811.

Franceschi C., Bonafe M., Valensin S., Olivieri F., De Luca M., Ottaviani E., De Benedictis G. (2000) Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann N Y Acad Sci* **908:** 244-254.

Friedman D. B., Johnson T. E. (1988) Three mutants that extend both mean and maximum life span of the nematode, *Caenorhabditis elegans*, define the age-1 gene. *J Gerontol* **43:** B102-109.

Garigan D., Hsu A. L., Fraser A. G., Kamath R. S., Ahringer J., Kenyon C. (2002) Genetic analysis of tissue aging in *Caenorhabditis elegans*: a role for heat-shock factor and bacterial proliferation. *Genetics* **161:** 1101-1112.

Garsin D. A., Villanueva J. M., Begun J., Kim D. H., Sifri C. D., Calderwood S. B., Ruvkun G., Ausubel F. M. (2003) Long-lived *C. elegans daf-2* mutants are resistant to bacterial pathogens. *Science* **300:** 1921.

Gergely J Erdei A, László G. A természetes és az adatptív immunitás kapcsolata, Citokinek és citokinreceptorok, A komplemetrendszer. In: Gergely J EA (szerk.) Immunbiológia. Medicina Könykiadó Rt., Budapest, 2000: 55-61, 141-158, 249-268

Girard L. R., Fiedler T. J., Harris T. W., Carvalho F., Antoshechkin I., Han M., Sternberg P. W., Stein L. D., Chalfie M. (2007) WormBook: the online review of *Caenorhabditis elegans* biology. *Nucleic Acids Res* **35:** D472-475.

Harvey C. J., Thimmulappa R. K., Sethi S., Kong X., Yarmus L., Brown R. H., Feller-Kopman D., Wise R., Biswal S. (2011) Targeting Nrf2 signaling improves bacterial clearance by alveolar macrophages in patients with COPD and in a mouse model. *Sci Transl Med* **3:** 78ra32.

Hasegawa K., Miwa S., Isomura K., Tsutsumiuchi K., Taniguchi H., Miwa J. (2008) Acrylamide-responsive genes in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Toxicol Sci* **101:** 215-225.

He C. H., Gong P., Hu B., Stewart D., Choi M. E., Choi A. M., Alam J. (2001) Identification of activating transcription factor 4 (ATF4) as an Nrf2-interacting protein. Implication for heme oxygenase-1 gene regulation. *J Biol Chem* **276:** 20858-20865.

Hoeven R., McCallum K. C., Cruz M. R., Garsin D. A. (2011) Ce-Duox1/BLI-3 generated reactive oxygen species trigger protective SKN-1 activity via p38 MAPK signaling during infection in *C. elegans*. *PLoS Pathog* **7:** e1002453.

Hoffmann R., Valencia A. (2004) A gene network for navigating the literature. *Nat Genet* **36:** 664.

Horowitz M., Robinson S. D. (2007) Heat shock proteins and the heat shock response during hyperthermia and its modulation by altered physiological conditions. *Prog Brain Res* **162:** 433-446.

Hu F., Yu X., Wang H., Zuo D., Guo C., Yi H., Tirosh B., Subjeck J. R., Qiu X., Wang X. Y. (2011) ER stress and its regulator X-box-binding protein-1 enhance polyIC-induced innate immune response in dendritic cells. *Eur J Immunol* **41:** 1086-1097.

Inoue H., Hisamoto N., An J. H., Oliveira R. P., Nishida E., Blackwell T. K., Matsumoto K. (2005) The *C. elegans* p38 MAPK pathway regulates nuclear localization of the transcription factor SKN-1 in oxidative stress response. *Genes Dev* **19:** 2278-2283.

Itoh K., Chiba T., Takahashi S., Ishii T., Igarashi K., Katoh Y., Oyake T., Hayashi N., Satoh K., Hatayama I., Yamamoto M., Nabeshima Y. (1997) An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem Biophys Res Commun* **236:** 313-322.

Itoh K., Wakabayashi N., Katoh Y., Ishii T., Igarashi K., Engel J. D., Yamamoto M. (1999) Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev* **13:** 76-86.

Jiang T., Huang Z., Lin Y., Zhang Z., Fang D., Zhang D. D. (2010) The protective role of Nrf2 in streptozotocin-induced diabetic nephropathy. *Diabetes* **59:** 850-860.

Johnson D. A., Amirahmadi S., Ward C., Fabry Z., Johnson J. A. (2010) The absence of the pro-antioxidant transcription factor Nrf2 exacerbates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Toxicol Sci* **114:** 237-246.

Kanninen K., White A. R., Koistinaho J., Malm T. Targeting Glycogen Synthase Kinase-3beta for Therapeutic Benefit against Oxidative Stress in Alzheimer's Disease: Involvement of the Nrf2-ARE Pathway. *Int J Alzheimers Dis* **2011:** 985085.

Kato Y., Aizawa T., Hoshino H., Kawano K., Nitta K., Zhang H. (2002) *abf-1* and *abf-2*, ASABF-type antimicrobial peptide genes in *Caenorhabditis elegans*. *Biochem J* **361:** 221-230.

Katoh Y., Itoh K., Yoshida E., Miyagishi M., Fukamizu A., Yamamoto M. (2001) Two domains of Nrf2 cooperatively bind CBP, a CREB binding protein, and synergistically activate transcription. *Genes Cells* **6:** 857-868.

Kell A., Ventura N., Kahn N., Johnson T. E. (2007) Activation of SKN-1 by novel kinases in *Caenorhabditis elegans*. *Free Radic Biol Med* **43:** 1560-1566.

Kensler T. W., Wakabayashi N., Biswal S. (2007) Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **47:** 89-116.

Kenyon C., Chang J., Gensch E., Rudner A., Tabtiang R. (1993) A *C. elegans* mutant that lives twice as long as wild type. *Nature* **366:** 461-464.

Ki S. H., Cho I. J., Choi D. W., Kim S. G. (2005) Glucocorticoid receptor (GR)-associated SMRT binding to C/EBPbeta TAD and Nrf2 Neh4/5: role of SMRT recruited to GR in GSTA2 gene repression. *Mol Cell Biol* **25:** 4150-4165.

Kim D. H., Feinbaum R., Alloing G., Emerson F. E., Garsin D. A., Inoue H., Tanaka-Hino M., Hisamoto N., Matsumoto K., Tan M. W., Ausubel F. M. (2002) A conserved p38 MAP kinase pathway in *Caenorhabditis elegans* innate immunity. *Science* **297:** 623-626.

Kim D. H., Liberati N. T., Mizuno T., Inoue H., Hisamoto N., Matsumoto K., Ausubel F. M. (2004) Integration of *Caenorhabditis elegans* MAPK pathways mediating immunity and stress resistance by MEK-1 MAPK kinase and VHP-1 MAPK phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101:** 10990-10994.

Kim J., Cha Y. N., Surh Y. J. (2009) A protective role of nuclear factor-erythroid 2-related factor-2 (Nrf2) in inflammatory disorders. *Mutat Res*.

Kim Y. J., Ahn J. Y., Liang P., Ip C., Zhang Y., Park Y. M. (2007) Human prx1 gene is a target of Nrf2 and is up-regulated by hypoxia/reoxygenation: implication to tumor biology. *Cancer Res* **67:** 546-554.

Kobayashi A., Kang M. I., Okawa H., Ohtsuji M., Zenke Y., Chiba T., Igarashi K., Yamamoto M. (2004) Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Mol Cell Biol* **24:** 7130-7139.

Kobayashi M., Yamamoto M. (2005) Molecular mechanisms activating the Nrf2-Keap1 pathway of antioxidant gene regulation. *Antioxid Redox Signal* **7:** 385-394.

Kong X., Thimmulappa R., Craciun F., Harvey C., Singh A., Kombairaju P., Reddy S. P., Remick D., Biswal S. (2011) Enhancing Nrf2 pathway by disruption of Keap1 in myeloid leukocytes protects against sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* **184:** 928-938.

Korcsmaros T., Farkas I. J., Szalay M. S., Rovo P., Fazekas D., Spiro Z., Bode C., Lenti K., Vellai T., Csermely P. (2010) Uniformly curated signaling pathways reveal tissue-specific cross-talks and support drug target discovery. *Bioinformatics* **26:** 2042-2050.

Kurz C. L., Tan M. W. (2004) Regulation of aging and innate immunity in *C. elegans*. *Aging Cell* **3:** 185-193.

Kyriakis J. M., Avruch J. (2001) Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* **81:** 807-869.

Lau A., Villeneuve N. F., Sun Z., Wong P. K., Zhang D. D. (2008) Dual roles of Nrf2 in cancer. *Pharmacol Res* **58:** 262-270.

Laws T. R., Harding S. V., Smith M. P., Atkins T. P., Titball R. W. (2004) Age influences resistance of *Caenorhabditis elegans* to killing by pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Lett* **234:** 281-287.

Lee J. M., Chan K., Kan Y. W., Johnson J. A. (2004) Targeted disruption of Nrf2 causes regenerative immune-mediated hemolytic anemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101:** 9751-9756.

Lee T. D., Yang H., Whang J., Lu S. C. (2005) Cloning and characterization of the human glutathione synthetase 5'-flanking region. *Biochem J* **390:** 521-528.

Leonard M. O., Kieran N. E., Howell K., Burne M. J., Varadarajan R., Dhakshinamoorthy S., Porter A. G., O'Farrelly C., Rabb H., Taylor C. T. (2006) Reoxygenation-specific activation of the antioxidant transcription factor Nrf2 mediates cytoprotective gene expression in ischemia-reperfusion injury. *FASEB J* **20:** 2624-2626.

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 Genet* **7:** e1002119.

Liberati N. T., Fitzgerald K. A., Kim D. H., Feinbaum R., Golenbock D. T., Ausubel F. M. (2004) Requirement for a conserved Toll/interleukin-1 resistance domain protein in the *Caenorhabditis elegans* immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101:** 6593-6598.

Lin R. (2003) A gain-of-function mutation in *oma-1*, a *C. elegans* gene required for oocyte maturation, results in delayed degradation of maternal proteins and embryonic lethality. *Dev Biol* **258:** 226-239.

Liot G., Bossy B., Lubitz S., Kushnareva Y., Sejbuk N., Bossy-Wetzel E. (2009) Complex II inhibition by 3-NP causes mitochondrial fragmentation and neuronal cell death via an NMDA- and ROS-dependent pathway. *Cell Death Differ* **16:** 899-909.

Luo S., Shaw W. M., Ashraf J., Murphy C. T. (2009) TGF-beta Sma/Mab signaling mutations uncouple reproductive aging from somatic aging. *PLoS Genet* **5:** e1000789.

Lynn D. J., Chan C., Naseer M., Yau M., Lo R., Sribnaia A., Ring G., Que J., Wee K., Winsor G. L., Laird M. R., Breuer K., Foroushani A. K., Brinkman F. S., Hancock R. E. (2010) Curating the innate immunity interactome. *BMC Syst Biol* **4:** 117.

Ma Q., Battelli L., Hubbs A. F. (2006) Multiorgan autoimmune inflammation, enhanced lymphoproliferation, and impaired homeostasis of reactive oxygen species in mice lacking the antioxidant-activated transcription factor Nrf2. *Am J Pathol* **168:** 1960-1974.

Maduro M. F., Kasmir J. J., Zhu J., Rothman J. H. (2005) The Wnt effector POP-1 and the PAL-1/Caudal homeoprotein collaborate with SKN-1 to activate *C. elegans* endoderm development. *Dev Biol* **285:** 510-523.

Mallo G. V., Kurz C. L., Couillault C., Pujol N., Granjeaud S., Kohara Y., Ewbank J. J. (2002) Inducible antibacterial defense system in *C. elegans*. *Curr Biol* **12:** 1209-1214.

Marini M. G., Asunis I., Chan K., Chan J. Y., Kan Y. W., Porcu L., Cao A., Moi P. (2002) Cloning MafF by recognition site screening with the NFE2 tandem repeat of HS2: analysis of its role in globin and GCSl genes regulation. *Blood Cells Mol Dis* **29:** 145-158.

Martin-Montalvo A., Villalba J. M., Navas P., de Cabo R. (2011) NRF2, cancer and calorie restriction. *Oncogene* **30:** 505-520.

Means T. K., Mylonakis E., Tampakakis E., Colvin R. A., Seung E., Puckett L., Tai M. F., Stewart C. R., Pukkila-Worley R., Hickman S. E., Moore K. J., Calderwood S. B., Hacohen N., Luster A. D., El Khoury J. (2009) Evolutionarily conserved recognition and innate immunity to fungal pathogens by the scavenger receptors SCARF1 and CD36. *J Exp Med* **206:** 637-653.

Mohler J., Vani K., Leung S., Epstein A. (1991) Segmentally restricted, cephalic expression of a leucine zipper gene during *Drosophila* embryogenesis. *Mech Dev* **34:** 3-9.

Mohri-Shiomi A., Garsin D. A. (2008) Insulin signaling and the heat shock response modulate protein homeostasis in the *Caenorhabditis elegans* intestine during infection. *J Biol Chem* **283:** 194-201.

Motohashi H., Yamamoto M. (2004) Nrf2-Keap1 defines a physiologically important stress response mechanism. *Trends Mol Med* **10:** 549-557.

Moy T. I., Mylonakis E., Calderwood S. B., Ausubel F. M. (2004) Cytotoxicity of hydrogen peroxide produced by *Enterococcus faecium*. *Infect Immun* **72:** 4512-4520.

Muir R. E., Tan M. W. (2008) Virulence of *Leucobacter chromiireducens* subsp. solipictus to *Caenorhabditis elegans*: characterization of a novel host-pathogen interaction. *Appl Environ Microbiol* **74:** 4185-4198.

Nagai N., Thimmulappa R. K., Cano M., Fujihara M., Izumi-Nagai K., Kong X., Sporn M. B., Kensler T. W., Biswal S., Handa J. T. (2009) Nrf2 is a critical modulator of the innate immune response in a model of uveitis. *Free Radic Biol Med* **47:** 300-306.

Nakamura B. N., Lawson G., Chan J. Y., Banuelos J., Cortes M. M., Hoang Y. D., Ortiz L., Rau B. A., Luderer U. (2010) Knockout of the transcription factor NRF2 disrupts spermatogenesis in an age-dependent manner. *Free Radic Biol Med* **49:** 1368-1379.

Nemoto-Sasaki Y., Hayama K., Ohya H., Arata Y., Kaneko M. K., Saitou N., Hirabayashi J., Kasai K. (2008) *Caenorhabditis elegans* galectins LEC-1-LEC-11: structural features and sugar-binding properties. *Biochim Biophys Acta* **1780:** 1131-1142.

Nicholas H. R., Hodgkin J. (2004) The ERK MAP kinase cascade mediates tail swelling and a protective response to rectal infection in *C. elegans*. *Curr Biol* **14:** 1256-1261.

Nioi P., Nguyen T., Sherratt P. J., Pickett C. B. (2005) The carboxy-terminal Neh3 domain of Nrf2 is required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* **25:** 10895-10906.

Niture S. K., Jain A. K., Jaiswal A. K. (2009) Antioxidant-induced modification of INrf2 cysteine 151 and PKC-delta-mediated phosphorylation of Nrf2 serine 40 are both required for stabilization and nuclear translocation of Nrf2 and increased drug resistance. *J Cell Sci* **122:** 4452-4464.

Niture S. K., Jain A. K., Shelton P. M., Jaiswal A. K. (2011) Src subfamily kinases regulate nuclear export and degradation of transcription factor Nrf2 to switch off Nrf2-mediated antioxidant activation of cytoprotective gene expression. *J Biol Chem* **286:** 28821-28832.

Nouhi Z., Chevillard G., Derjuga A., Blank V. (2007) Endoplasmic reticulum association and N-linked glycosylation of the human Nrf3 transcription factor. *FEBS Lett* **581:** 5401-5406.

Ogborne R. M., Rushworth S. A., O'Connell M. A. (2005) Alpha-lipoic acid-induced heme oxygenase-1 expression is mediated by nuclear factor erythroid 2-related factor 2 and p38 mitogen-activated protein kinase in human monocytic cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25:** 2100-2105.

Oh S. W., Mukhopadhyay A., Dixit B. L., Raha T., Green M. R., Tissenbaum H. A. (2006) Identification of direct DAF-16 targets controlling longevity, metabolism and diapause by chromatin immunoprecipitation. *Nat Genet* **38:** 251-257.

Oliveira R. P., Porter Abate J., Dilks K., Landis J., Ashraf J., Murphy C. T., Blackwell T. K. (2009) Condition-adapted stress and longevity gene regulation by *Caenorhabditis elegans* SKN-1/Nrf. *Aging Cell* **8:** 524-541.

Papp D., Csermely P., Soti C. (2012a) A Role for SKN-1/Nrf in Pathogen Resistance and Immunosenescence in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Pathog* **8:** e1002673.

Papp D., Lenti K., Modos D., Fazekas D., Dul Z., Turei D., Foldvari-Nagy L., Nussinov R., Csermely P., Korcsmaros T. (2012b) The NRF2-related interactome and regulome contain multifunctional proteins and fine-tuned autoregulatory loops. *FEBS Lett*.

Park S. K., Tedesco P. M., Johnson T. E. (2009) Oxidative stress and longevity in *Caenorhabditis elegans* as mediated by SKN-1. *Aging Cell* **8:** 258-269.

Partridge F. A., Gravato-Nobre M. J., Hodgkin J. (2010) Signal transduction pathways that function in both development and innate immunity. *Dev Dyn* **239:** 1330-1336.

Peng S. L. (2008) Foxo in the immune system. *Oncogene* **27:** 2337-2344.

Powell J. R., Ausubel F. M. (2008) Models of *Caenorhabditis elegans* infection by bacterial and fungal pathogens. *Methods Mol Biol* **415:** 403-427.

Pradel E., Zhang Y., Pujol N., Matsuyama T., Bargmann C. I., Ewbank J. J. (2007) Detection and avoidance of a natural product from the pathogenic bacterium *Serratia marcescens* by *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104:** 2295-2300.

Przybysz A. J., Choe K. P., Roberts L. J., Strange K. (2009) Increased age reduces DAF-16 and SKN-1 signaling and the hormetic response of *Caenorhabditis elegans* to the xenobiotic juglone. *Mech Ageing Dev* **130:** 357-369.

Pujol N., Link E. M., Liu L. X., Kurz C. L., Alloing G., Tan M. W., Ray K. P., Solari R., Johnson C. D., Ewbank J. J. (2001) A reverse genetic analysis of components of the Toll signaling pathway in *Caenorhabditis elegans*. *Curr Biol* **11:** 809-821.

Pujol N., Zugasti O., Wong D., Couillault C., Kurz C. L., Schulenburg H., Ewbank J. J. (2008) Anti-fungal innate immunity in *C. elegans* is enhanced by evolutionary diversification of antimicrobial peptides. *PLoS Pathog* **4:** e1000105.

Pukkila-Worley R., Ausubel F. M. (2012) Immune defense mechanisms in the *Caenorhabditis elegans* intestinal epithelium. *Curr Opin Immunol* **24:** 3-9.

Rada P., Rojo A. I., Chowdhry S., McMahon M., Hayes J. D., Cuadrado A. (2011) SCF/{beta}-TrCP promotes glycogen synthase kinase 3-dependent degradation of the Nrf2 transcription factor in a Keap1-independent manner. *Mol Cell Biol* **31:** 1121-1133.

Rahman I., MacNee W. (1996) Role of oxidants/antioxidants in smoking-induced lung diseases. *Free Radic Biol Med* **21:** 669-681.

Ramos-Gomez M., Kwak M. K., Dolan P. M., Itoh K., Yamamoto M., Talalay P., Kensler T. W. (2001) Sensitivity to carcinogenesis is increased and chemoprotective efficacy of enzyme inducers is lost in nrf2 transcription factor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98:** 3410-3415.

Rangasamy T., Cho C. Y., Thimmulappa R. K., Zhen L., Srisuma S. S., Kensler T. W., Yamamoto M., Petrache I., Tuder R. M., Biswal S. (2004) Genetic ablation of Nrf2 enhances susceptibility to cigarette smoke-induced emphysema in mice. *J Clin Invest* **114:** 1248-1259.

Rangasamy T., Guo J., Mitzner W. A., Roman J., Singh A., Fryer A. D., Yamamoto M., Kensler T. W., Tuder R. M., Georas S. N., Biswal S. (2005) Disruption of Nrf2 enhances susceptibility to severe airway inflammation and asthma in mice. *J Exp Med* **202:** 47-59.

Richardson C. E., Kooistra T., Kim D. H. (2010) An essential role for XBP-1 in host protection against immune activation in *C. elegans*. *Nature* **463:** 1092-1095.

Robida-Stubbs S., Glover-Cutter K., Lamming D. W., Mizunuma M., Narasimhan S. D., Neumann-Haefelin E., Sabatini D. M., Blackwell T. K. (2012) TOR signaling and rapamycin influence longevity by regulating SKN-1/Nrf and DAF-16/FoxO. *Cell Metab* **15:** 713-724.

Roeder T., Stanisak M., Gelhaus C., Bruchhaus I., Grotzinger J., Leippe M. (2010) Caenopores are antimicrobial peptides in the nematode *Caenorhabditis elegans* instrumental in nutrition and immunity. *Dev Comp Immunol* **34:** 203-209.

Rojo A. I., Innamorato N. G., Martin-Moreno A. M., De Ceballos M. L., Yamamoto M., Cuadrado A. (2010) Nrf2 regulates microglial dynamics and neuroinflammation in experimental Parkinson's disease. *Glia* **58:** 588-598.

Salazar M., Rojo A. I., Velasco D., de Sagarra R. M., Cuadrado A. (2006) Glycogen synthase kinase-3beta inhibits the xenobiotic and antioxidant cell response by direct phosphorylation and nuclear exclusion of the transcription factor Nrf2. *J Biol Chem* **281:** 14841-14851.

Schulenburg H., Hoeppner M. P., Weiner J., 3rd, Bornberg-Bauer E. (2008) Specificity of the innate immune system and diversity of C-type lectin domain (CTLD) proteins in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Immunobiology* **213:** 237-250.

Schuster E., McElwee J. J., Tullet J. M., Doonan R., Matthijssens F., Reece-Hoyes J. S., Hope I. A., Vanfleteren J. R., Thornton J. M., Gems D. (2010) DamID in *C. elegans* reveals longevity-associated targets of DAF-16/FoxO. *Mol Syst Biol* **6:** 399.

Shah Z. A., Li R. C., Thimmulappa R. K., Kensler T. W., Yamamoto M., Biswal S., Dore S. (2007) Role of reactive oxygen species in modulation of Nrf2 following ischemic reperfusion injury. *Neuroscience* **147:** 53-59.

Shapira M., Hamlin B. J., Rong J., Chen K., Ronen M., Tan M. W. (2006) A conserved role for a GATA transcription factor in regulating epithelial innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103:** 14086-14091.

Shaw A. C., Joshi S., Greenwood H., Panda A., Lord J. M. (2010) Aging of the innate immune system. *Curr Opin Immunol* **22:** 507-513.

Shivers R. P., Pagano D. J., Kooistra T., Richardson C. E., Reddy K. C., Whitney J. K., Kamanzi O., Matsumoto K., Hisamoto N., Kim D. H. (2010) Phosphorylation of the conserved transcription factor ATF-7 by PMK-1 p38 MAPK regulates innate immunity in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet* **6:** e1000892.

Sibhatu M. B., Smitherman P. K., Townsend A. J., Morrow C. S. (2008) Expression of MRP1 and GSTP1-1 modulate the acute cellular response to treatment with the chemopreventive isothiocyanate, sulforaphane. *Carcinogenesis* **29:** 807-815.

Singh V., Aballay A. (2006a) Heat-shock transcription factor (HSF)-1 pathway required for *Caenorhabditis elegans* immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103:** 13092-13097.

Singh V., Aballay A. (2006b) Heat shock and genetic activation of HSF-1 enhance immunity to bacteria. *Cell Cycle* **5:** 2443-2446.

Singh V., Aballay A. (2009) Regulation of DAF-16-mediated Innate Immunity in *Caenorhabditis elegans*. *J Biol Chem* **284:** 35580-35587.

Smoot M. E., Ono K., Ruscheinski J., Wang P. L., Ideker T. (2011) Cytoscape 2.8: new features for data integration and network visualization. *Bioinformatics* **27:** 431-432.

Strachan G. D., Morgan K. L., Otis L. L., Caltagarone J., Gittis A., Bowser R., Jordan-Sciutto K. L. (2004) Fetal Alz-50 clone 1 interacts with the human orthologue of the Kelch-like Ech-associated protein. *Biochemistry* **43:** 12113-12122.

Sulston J. E., Horvitz H. R. (1977) Post-embryonic cell lineages of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* **56:** 110-156.

Surh Y. J. (2003) Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nat Rev Cancer* **3:** 768-780.

Surh Y. J., Kundu J. K., Na H. K., Lee J. S. (2005) Redox-sensitive transcription factors as prime targets for chemoprevention with anti-inflammatory and antioxidative phytochemicals. *J Nutr* **135:** 2993S-3001S.

Sykiotis G. P., Bohmann D. (2010) Stress-activated cap'n'collar transcription factors in aging and human disease. *Sci Signal* **3:** re3.

Taguchi K., Motohashi H., Yamamoto M. (2011) Molecular mechanisms of the Keap1-Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes Cells* **16:** 123-140.

Theodore M., Kawai Y., Yang J., Kleshchenko Y., Reddy S. P., Villalta F., Arinze I. J. (2008) Multiple nuclear localization signals function in the nuclear import of the transcription factor Nrf2. *J Biol Chem* **283:** 8984-8994.

Thimmulappa R. K., Lee H., Rangasamy T., Reddy S. P., Yamamoto M., Kensler T. W., Biswal S. (2006) Nrf2 is a critical regulator of the innate immune response and survival during experimental sepsis. *J Clin Invest* **116:** 984-995.

Troemel E. R., Chu S. W., Reinke V., Lee S. S., Ausubel F. M., Kim D. H. (2006) p38 MAPK regulates expression of immune response genes and contributes to longevity in *C. elegans*. *PLoS Genet* **2:** e183.

Tufekci K. U., Civi Bayin E., Genc S., Genc K. (2011) The Nrf2/ARE Pathway: A Promising Target to Counteract Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease. *Parkinsons Dis* **2011:** 314082.

Tullet J. M., Hertweck M., An J. H., Baker J., Hwang J. Y., Liu S., Oliveira R. P., Baumeister R., Blackwell T. K. (2008) Direct inhibition of the longevity-promoting factor SKN-1 by insulin-like signaling in *C. elegans*. *Cell* **132:** 1025-1038.

van Horssen J., Drexhage J. A., Flor T., Gerritsen W., van der Valk P., de Vries H. E. (2010) Nrf2 and DJ1 are consistently upregulated in inflammatory multiple sclerosis lesions. *Free Radic Biol Med* **49:** 1283-1289.

Vellai T., Takacs-Vellai K., Zhang Y., Kovacs A. L., Orosz L., Muller F. (2003) Genetics: influence of TOR kinase on lifespan in *C. elegans*. *Nature* **426:** 620.

Venugopal R., Jaiswal A. K. (1998) Nrf2 and Nrf1 in association with Jun proteins regulate antioxidant response element-mediated expression and coordinated induction of genes encoding detoxifying enzymes. *Oncogene* **17:** 3145-3156.

Walker A. K., See R., Batchelder C., Kophengnavong T., Gronniger J. T., Shi Y., Blackwell T. K. (2000) A conserved transcription motif suggesting functional parallels between Caenorhabditis elegans SKN-1 and Cap'n'Collar-related basic leucine zipper proteins. *J Biol Chem* **275:** 22166-22171.

Weiskopf D., Weinberger B., Grubeck-Loebenstein B. (2009) The aging of the immune system. *Transpl Int* **22:** 1041-1050.

Wruck C. J., Fragoulis A., Gurzynski A., Brandenburg L. O., Kan Y. W., Chan K., Hassenpflug J., Freitag-Wolf S., Varoga D., Lippross S., Pufe T. (2011) Role of oxidative stress in rheumatoid arthritis: insights from the Nrf2-knockout mice. *Ann Rheum Dis* **70:** 844-850.

Xu C., Yuan X., Pan Z., Shen G., Kim J. H., Yu S., Khor T. O., Li W., Ma J., Kong A. N. (2006) Mechanism of action of isothiocyanates: the induction of ARE-regulated genes is associated with activation of ERK and JNK and the phosphorylation and nuclear translocation of Nrf2. *Mol Cancer Ther* **5:** 1918-1926.

Yoh K., Itoh K., Enomoto A., Hirayama A., Yamaguchi N., Kobayashi M., Morito N., Koyama A., Yamamoto M., Takahashi S. (2001) Nrf2-deficient female mice develop lupus-like autoimmune nephritis. *Kidney Int* **60:** 1343-1353.

Yook K., Harris T. W., Bieri T., Cabunoc A., Chan J., Chen W. J., Davis P., de la Cruz N., Duong A., Fang R., Ganesan U., Grove C., Howe K., Kadam S., Kishore R., Lee R., Li Y., Muller H. M., Nakamura C., Nash B., Ozersky P., Paulini M., Raciti D., Rangarajan A., Schindelman G., Shi X., Schwarz E. M., Ann Tuli M., Van Auken K., Wang D., Wang X., Williams G., Hodgkin J., Berriman M., Durbin R., Kersey P., Spieth J., Stein L., Sternberg P. W. (2012) WormBase 2012: more genomes, more data, new website. *Nucleic Acids Res* **40:** D735-741.

Youngman M. J., Rogers Z. N., Kim D. H. (2011) A decline in p38 MAPK signaling underlies immunosenescence in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet* **7:** e1002082.

Zhang D. D. (2006) Mechanistic studies of the Nrf2-Keap1 signaling pathway. *Drug Metab Rev* **38:** 769-789.

Zhang Y., Crouch D. H., Yamamoto M., Hayes J. D. (2006) Negative regulation of the Nrf1 transcription factor by its N-terminal domain is independent of Keap1: Nrf1, but not Nrf2, is targeted to the endoplasmic reticulum. *Biochem J* **399:** 373-385.

Ziegler K., Kurz C. L., Cypowyj S., Couillault C., Pophillat M., Pujol N., Ewbank J. J. (2009) Antifungal innate immunity in *C. elegans*: PKCdelta links G protein signaling and a conserved p38 MAPK cascade. *Cell Host Microbe* **5:** 341-352.

10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

A doktori disszertáció témájához kapcsolódó publikációk:

Papp D., Csermely P., Soti C. (2012) A Role for SKN-1/Nrf in Pathogen Resistance and Immunosenescence in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Pathog* 8:(4) e1002673 (IF: 9,127)

Papp D., Lenti K., Modos D., Fazekas D., Dul Z., Turei D., Foldvari-Nagy L., Nussinov R., Csermely P., Korcsmaros T. (2012) The NRF2-related interactome and regulome contain multifunctional proteins and fine-tuned autoregulatory loops. *FEBS Lett*. 586(13):1795-802 (IF: 3,538)

A doktori disszertáció témájához nem kapcsolódó publikációk:

Cabreiro F., Ackerman D., Doonan R., Araiz C., Back P., **Papp D.**, Braeckman B. P., Gems D. (2011) Increased life span from overexpression of superoxide dismutase in *Caenorhabditis elegans* is not caused by decreased oxidative damage. *Free Radic Biol Med*. 51(8):1575-82. (IF: 5,423)

Dancso B., Spiro Z., Arslan M. A., Nguyen M. T., **Papp D.**, Csermely P., Soti C. (2010) The heat shock connection of metabolic stress and dietary restriction. *Curr Pharm Biotechnol* 11: 139-145. (IF: 3,455)

Biro A., Rovo Z., **Papp D.**, Cervenak L., Varga L., Fust G., Thielens N. M., Arlaud G. J., Prohaszka Z. (2007) Studies on the interactions between C-reactive protein and complement proteins. *Immunology* 121: 40-50. (IF: 3,398)

Papp D., Prohaszka Z., Kocsis J., Fust G., Banhegyi D., Raynes D. A., Guerriero V. (2005) Development of a sensitive assay for the measurement of antibodies against heat shock protein binding protein 1 (HspBP1): increased levels of anti-HspBP1 IgG are prevalent in HIV infected subjects. *J Med Virol* 76: 464-469. (IF: 2,52)

11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Sőti Csabának, laborvezetőmnek, prof. Csermely Péternek, valamint prof. Mandl József volt és prof. Bánhegyi Gábor jelenlegi intézetigazgató uraknak, hogy doktori munkámat a Semmelweis Egyetem Doktori Iskolájában az Orvosi Vegytani, Molekuláris Biológiai és Patobiokémiai Intézetben végezhettem. Köszönöm Gilányi Beatrixnak, hogy mindig készségesen segített az ügyintézésekben. Köszönöm a Stressz-csoport és LINKGroup jelenlegi és volt tagjainak valamint az Intézet dolgozóinak a közös munkát és hogy lehetővé tették azt, hogy kísérleteimet akár extrém időben is elvégezhessem. Külön szeretném megköszönni a Semmelweis Egyetem Élettani Intézetében Dr. Mócsai Attilának és a Gyulladásbiológiai csoport többi tagjának, hogy használhattam a fluoreszcens mikroszkópot vizsgálataimhoz. Prof. Dr. Spät Andrásnak és Dr. Szanda Gergőnek köszönettel tartozom, hogy lehetővé tették, hogy konfokális mikroszkópos felvételek készüljenek az állatokról.

Külön köszönettel tartozom Keith Blackwell professzornak, hogy számos *C. elegans* és baktérium törzzsel hozzájárult az SKN-1 projekt beindításához, valamint a 2010-es madisoni *C. elegans* konferencián tanácsaival és kérdéseivel segítette a téma részletesebb kibontását. Köszönöm továbbá Johji Miwa, Andy Golden, Keith P. Choe, David W. Wareham és Jonathan J. Ewbank kutatóknak, hogy törzsekkel segítették a doktori munkám elkészítését.

Köszönettel tartozom jelenlegi főnökömnek, Vellai Tibornak, hogy anyagi támogatással, valamint javaslataival lehetővé tette a doktori munkám befejezését, a publikációk elkészítését. Továbbá szeretném megköszönni az ELTE Genetikai Tanszék *C. elegans* kutatócsoportjának az előadásaimra adott reflexiókat, amelyek szintén segítettek a kérdéses részek tisztázásában.

Végül családomnak szeretném megköszönni a végtelen türelmet és megértést, amivel munkamániásságom iránt viseltettek. Külön szeretném megköszönni férjemnek, Korcsmáros Tamásnak odaadó támogatását, aki nélkül nem jöhetett volna létre ez a disszertáció. Köszönöm, hogy elengedett David Gems csoportjába, ahol rengeteget tanultam és új élményekkel töltődtem fel. Itt született meg közös projektünk ötlete is, amelyet az általa vezetett Hálózatbiológiai csoporttal közösen dolgoztunk ki. Ezúton szeretném megköszönni nekik is a közös munkát az NRF2 interaktóm elemzésében.

12. MELLÉKLET

Az NRF2 interakciós partnereinek kézi gyűjtéssel készített adatbázisa

Faj	Fehérje 1	UniProt 1	Fehérje 2	UniProt 2	Interakció típusa	Interakció hatása	Interakció részletei	PMID
majom / humán	Rbx1	P62877	NRF2	Q16236	közvetlen	gátlás	az NRF2 N-terminális Neh2 domén lizinjének ubikvitinálása	15572695
egér	Keap1	Q14145	FAC1	Q12830	közvetlen	gátlás	a FAC1 PEST doménje köti a Keap1 Kelch ismétlődéseket	15379550
humán	Keap1	Q14145	IKKβ	O14920	közvetlen	gátlás	A Keap1 C-terminális Kelch doménje köti a IKKβ kináz doménjét	20600852
egér / patkány	SMRT	Q9Y618	C/EBPβ	Q92879	közvetlen	gátlás	SMRT kötődik a C/EBPbeta TAD doménjéhez	15870285
egér / patkány	SMRT	Q9Y618	Nrf2	Q60795	közvetlen	gátlás	SMRT kötődik az Nrf2 Neh4/5 doménjéhez	15870285
humán	Rbx1	P62877	IkBa	P25963	közvetlen	gátlás	RBX1/Cul1 Ubikvitinálja az IκBα-t	10230406
humán	GSK3β	Q6FI27	NRF2	Q16236	közvetlen	gátlás	foszforiláció Ser-en	16551619
egér	Fgr	P14234	NRF2	Q16236	közvetlen	gátlás	foszforiláció az Nrf2 Tyr568-n	21690096
egér	Fyn	P39688	NRF2	Q16236	közvetlen	gátlás	foszforiláció az Nrf2 Tyr568-n	21690096
egér	Src	P12931	NRF2	Q16236	közvetlen	gátlás	foszforiláció az Nrf2 Tyr568-n	21690096
egér	Yes	Q04736	NRF2	Q16236	közvetlen	gátlás	foszforiláció az Nrf2 Tyr568-n	21690096
humán	p38α	Q16539	NRF2	Q16236	közvetlen	gátlás	foszforilálja az Nrf2-t	16951197
humán	p38β	Q15759	NRF2	Q16236	közvetlen	gátlás	foszforilálja az Nrf2-t	16951197
humán	p38γ	P53778	NRF2	Q16236	közvetlen	gátlás	foszforilálja az Nrf2-t	16951197
humán	p38δ	O15264	NRF2	Q16236	közvetlen	gátlás	foszforilálja az Nrf2-t	16951197
humán	p65 (NF-κB)	O00221	CBP	Q9NWQ8	közvetlen	gátlás	p65 kötődik a CBP CH1-KIX doménjéhez	18241676

humán	HSP90	P08238	Keap1	Q14145	közvetlen	gátlás	a Keap1 NTR-je kötődik a Hsp90 CLD régióihoz	20864537
humán	Keap1	Q14145	NRF2	Q16236	közvetlen	gátlás	az Nrf2 Neh2 doménje kötődik a Keap1 DGR doménjéhez	9887101
humán	SQSTM1	Q13501	Keap1	Q14145	közvetlen	gátlás	p62 KIR motívuma kötődik a Keap1 Kelch ismétlődéseihez	20452972
majom	SFhERRβ	O95718	NRF2	Q16236	közvetlen	gátlás	a SFhERRβ D doménje valamint az A/B-C doménjei kötődnek az Nrf2-höz	17920186
humán	HDAC3	O15379	CBP	Q9NWQ8	közvetlen	gátlás	HDAC deacetilálja az CBP-t	18241676
egér	Keap1	Q14145	Bcl-2	P10417	közvetlen	gátlás	a Keap1 DGR doménje kötődik a Bcl-2 BH2 doménjéhez	20865015
humán	HDAC3	O15379	MafK	O60675	közvetlen	gátlás	a MafK C-terminális Zip doménje HDAC3 dokkoló felületet tartalmaz	18241676
humán	CRIF1	Q8TAE8	NRF2	Q16236	közvetlen	gátlás	CRIF1 kölcsönhatásba lép N- és C-terminális NRF2 régiókkal	20427290
humán	CK2	P68400	NRF2	Q16236	közvetlen	gátlás	CK2 foszforilálja Nrf2-t	17512459
humán	CK2	P68400	Keap1	Q14145	közvetlen	gátlás	CK2 foszforilálja Keap1 Thr55-et	20864537
humán	ProTα	-	Keap1	Q14145	közvetlen	gátlás	a Keap1 C-terminálisa kötődik ProT-alfához	15657435
humán	bTrCP1	Q9Y297	IkBa	P25963	közvetlen	gátlás	foszforilált IkBa-hoz kötődik	10066435
humán	bTrCP2	Q9UKB1	IkBa	P25963	közvetlen	gátlás	foszforilált IkBa-hoz kötődik	10066435
egér	β-TrCP	Q9Y297	NRF2	Q16236	közvetlen	gátlás	az Nrf2 Neh6 $[K(X)_nDSG(X)_{1-4}S$ konzervált motívuma kötődik a β-TrCP-höz	21245377
majom	CAND1	Q86VP6	Cul3	Q9JLV5	közvetlen	gátlás		16449638
humán	MafF	Q9ULX9	NRF2	Q16236	közvetlen	aktiválás	ZIP-ZIP dimerizáció	12490281
humán	MafF	Q9ULX9	Jun	P05412	közvetlen	aktiválás	ZIP-ZIP dimerizáció	12490281
humán	MafG	O15525	NRF2	Q16236	közvetlen	aktiválás	ZIP-ZIP dimerizáció	18585411

humán	PKCD	P28867	NRF2	Q16236	közvetlen	aktiválás	PKCδ foszforilálja Nrf2 S40-t	19920073
majom / humán	PKAc	P17612	p65 (NF-κB)	O00221	közvetlen	aktiválás	foszforilálja p65 S276-t	9660950
humán	JNK1	P45983	NRF2	Q16236	közvetlen	aktiválás	JNK1 foszforilálja NRF2-t	16308312
humán	ERK2	P28482	NRF2	Q16236	közvetlen	aktiválás	ERK2 foszforilálja NRF2-t	16308312
humán	PKC	P17252	NRF2	Q16236	közvetlen	aktiválás	foszforiláció Nrf2 Ser40-t (Neh2 domén)	12198130
egér	PERK	Q9NZJ5	NRF2	Q16236	közvetlen	aktiválás	PERK foszforilálja Nrf2-t	14517290
humán	KAP1	Q13263	NRF2	Q16236	közvetlen	aktiválás	KAP1 N-terminális régiói kötik Nrf2-NT-t	21382013
humán	Skp-1	P63208	Cullin-1	Q9JLV5	közvetlen	aktiválás	CUL1 N-terminális része köti Skp1 N-terminális részét	9663463
egér/majom	$p21^{Cip1/WAF1}$	Q13309	NRF2	Q16236	közvetlen	aktiválás	NRF2 N-terminális doménje (1–115) köti p21-t	19560419
humán	BRG1	P51532	NRF2	Q16236	közvetlen	aktiválás	Nrf2 toborozza BRG1-t a HO1 promóter távoli E1 és E2 enhanszerekhez	16923960
humán	NRF2	Q16236	YY1	P25490	közvetlen	aktiválás	Nrf2 köti YY1-t és elősegíti YY1 nukleáris lokalizációját	20309604
humán	CBP	Q9NWQ8	NRF2	Q16236	közvetlen	aktiválás	az NRF2 Neh4 és Neh5 doménjei kooperatívan kötik CBP TAD-t	11683914
majom	ATF4	P18848	NRF2	Q16236	közvetlen	aktiválás	leucin cipzár régiók	11274184
humán	c-Jun	P05412	NRF2	Q16236	közvetlen	aktiválás	heterodimer leucin cipzár régiókon keresztül	9872330
humán	c-Jun	P05412	NRF1	Q16656	közvetlen	aktiválás	heterodimer leucin cipzár régiókon keresztül	9872330
humán	Jun-B	P17275	NRF2	Q16236	közvetlen	aktiválás	heterodimer leucin cipzár régiókon keresztül	9872330
humán	Jun-B	P17275	NRF1	Q16656	közvetlen	aktiválás	heterodimer leucin cipzár régiókon keresztül	9872330
humán	JunD	P17535	NRF2	Q16236	közvetlen	aktiválás	heterodimer leucin cipzár	9872330

							régiókon keresztül	
humán	JunD	P17535	NRF1	Q16656	közvetlen	aktiválás	heterodimer leucin cipzár régiókon keresztül	9872330
majom / humán	PGAM5	Q96HS1	Keap1	Q14145	közvetlen	aktiválás	PGAM5 DxESGE motívuma köti Keap1 NxETGE motívumát	17046835
majom	MafK	O60675	NRF2	Q16236	közvetlen	aktiválás	a MafK C-terminális Zip doménje (77–156 as) leucin cipzár módon kötődik Nrf2-vel	8265578
egér	β-TrCP	Q9Y297	p100	Q9ULW0	közvetlen	aktiválás	a p100 C-terminális foszforilációs szekvencia köti β-TrCP-t	16303288
egér	CBP	Q9NWQ8	MafG	O15525	közvetlen	aktiválás	CBP acetilálja MafG-t elsősorban bázikus régiókban	11154691
humán	Keap1	Q14145	Cul3	Q9JLV5	közvetlen	aktiválás	a KEAP1 BTB doménje kötődik a CUL3 N-terminális régiójához	15282312
humán	p300 (CBP)	Q09472	NRF2	Q16236	közvetlen	aktiválás	Nrf2 acetilációja Neh1 DNS-kötő doménen	19273602
humán	SQSTM1	Q13501	LC3B	Q9GZQ8	közvetlen	aktiválás	a p62 22-aminosavnyi savas aminosav régiója (LIR) kötődik az LC3 N- és C-terminális aldoménjeihez	17580304
humán	CUL1	Q9JLV5	Rbx1	P62877	közvetlen	aktiválás		10230406
humán	JunD	P17535	NRF2	Q16236	közvetlen	aktiválás		16545679
humán	MafF	Q9ULX9	NRF1	Q16656	közvetlen	irányítatlan	ZIP-ZIP dimerizáció	12490281
humán	MafF	Q9ULX9	MafF	Q9ULX9	közvetlen	irányítatlan	ZIP-ZIP dimerizáció	12490281
humán (élesztőben)	PMF-1	Q6P1K2	NRF2	Q16236	közvetlen	irányítatlan	az Nrf2 leucin-cipzár régiója és a PMF-1 C-terminális coiled-coil régiója kötődik	11256947
patkány	Keap1	Q14145	miozin-VIIa	Q13402	közvetlen	irányítatlan	Keap1 C-terminális kelch-motívuma kötődik a miozin-VII SH3 doménjéhez	11921171

egér	Keap1	Q14145	aktin	?	közvetlen	irányítatlan	Keap1 molekulák a BTB doménjeiken keresztül dimerizáltak és F-aktin citoszkeletonhoz horgonyoznak Kelch vagy DGR régióikkal	15379550
humán	β-TrCP	Q9Y297	Skp-1	P63208	közvetlen	irányítatlan	a βTrCP N-terminálishoz közeli F box része köti Skp1-t	10531035
humán	Casp-3	P70677	NRF2	Q16236	közvetlen	irányítatlan	NRF2 hasítása casp-3 által két terméket eredményez: 30 kDa és 50 kDa	10510468
humán	Keap1	Q14145	ProTα	?	közvetlen	irányítatlan	a Keap1 C-terminális Kelch motívuma köti ProTα-t	15657435
humán	SQSTM1	Q13501	GABARAP	O95166	közvetlen	irányítatlan	a p62 22-aminosavnyi savas aminosav régiója (LIR) kötődik az LC3 N- és C-terminális aldoménjeihez	17580304
humán	SQSTM1	Q13501	GABARAPL 2	P60520	közvetlen	irányítatlan	a p62 22-aminosavnyi savas aminosav régiója (LIR) kötődik az LC3 N- és C-terminális aldoménjeihez	17580304
humán	SQSTM1	Q13501	GABARAPL 1	Q9H0R8	közvetlen	irányítatlan	a p62 22-aminosavnyi savas aminosav régiója (LIR) kötődik az LC3 N- és C-terminális aldoménjeihez	17580304
humán	SQSTM1	Q13501	LC3A	Q9H492	közvetlen	irányítatlan	a p62 22-aminosavnyi savas aminosav régiója (LIR) kötődik az LC3 N- és C-terminális aldoménjeihez	17580304
humán	BRCA1	P38398	NRF2	Q16236	közvetett; közvetlen (kzl.) predikció alapján	aktiválás	foszforilált aminosavak kötése ELM (LIG_BRCT_BRCA1_1) alapján	15520196

humán	ERα	P03372	NRF2	Q16236	közvetett; kzl. predikció alapján	gátlás	Nukleáris receptorok kötése ELM (LIG_NRBOX) alapján	20623181
patkány	PPARγ	P37231	NRF2	Q16236	közvetett; kzl. predikció alapján	gátlás	Nukleáris receptorok kötése ELM (LIG_NRBOX) alapján	10930400
humán / egér	Akt	P31749	NRF2	Q16236	közvetett; kzl. predikció alapján	aktiválás	Foszforiláció ELM (MOD_CK2_1, MOD_CDK_1, MOD_ProDKin_1, MOD_CK1_1, MOD_GSK3_1), és kináz dokkolás ELM (LIG_MAPK_1) alapján	19931411
humán / egér	ERK1	P27361	NRF2	Q16236	közvetett; kzl. predikció alapján	aktiválás	Foszforiláció ELM (MOD_CK2_1, MOD_CDK_1, MOD_ProDKin_1, MOD_CK1_1, MOD_GSK3_1), és kináz dokkolás ELM (LIG_MAPK_1) alapján	19931411
humán	IKKβ	O14920	NRF2	Q16236	közvetett; kzl. predikció alapján	gátlás	Foszforiláció ELM (MOD_CK2_1, MOD_CDK_1, MOD_ProDKin_1, MOD_CK1_1, MOD_GSK3_1), és kináz dokkolás ELM (LIG_MAPK_1) alapján	18241676
humán	MKK6	P52564	NRF2	Q16236	közvetett; kzl. predikció alapján	gátlás	Foszforiláció ELM (MOD_CK2_1, MOD_CDK_1, MOD_ProDKin_1, MOD_CK1_1, MOD_GSK3_1), és kináz dokkolás ELM (LIG_MAPK_1) alapján	16951197
humán	PI3K	P48736	NRF2	Q16236	közvetett; kzl. predikció alapján	aktiválás	foszforiláció ELM (MOD_PIKK_1) alapján	19272177

egér	GSK3β	Q6FI27	Yes	Q04736	közvetett; kzl. predikció alapján	aktiválás	Foszforiláció ELM (MOD_CK2_1, MOD_CDK_1, MOD_ProDKin_1, MOD_CK1_1, MOD_GSK3_1), és kináz dokkolás ELM (LIG_MAPK_1) alapján	21690096
egér	GSK3β	Q6FI27	Src	P12931	közvetett; kzl. predikció alapján	aktiválás	Foszforiláció ELM (MOD_CK2_1, MOD_CDK_1, MOD_ProDKin_1, MOD_CK1_1, MOD_GSK3_1), és kináz dokkolás ELM (LIG_MAPK_1) alapján	21690096
egér	GSK3β	Q6FI27	Fyn	P39688	közvetett; kzl. predikció alapján	aktiválás	Foszforiláció ELM (MOD_CK2_1, MOD_CDK_1, MOD_ProDKin_1, MOD_CK1_1, MOD_GSK3_1), és kináz dokkolás ELM (LIG_MAPK_1) alapján	21690096
egér	HIF-1	Q9BYW2	Bach1	P97302	közvetett; kzl. predikció alapján	aktiválás	fehérjekötés ELM (LIG_WW_Pin1_4) alapján	19254160
humán	Cul3	Q9JLV5	Rbx1	P62877	közvetlen	irányítatlan		15572695
humán	p65 (NF-κB)	O00221	HDAC3	O15379	közvetlen	irányítatlan		18241676
humán	NRF2	Q16236	CFTR	P13569	közvetett	gátlás		20309604
majom / humán	PGAM5	Q96HS1	NRF2	Q16236	közvetett	gátlás		18387606
humán	Bach1	P97302	NRF2	Q16236	közvetett	gátlás		19897490
humán	COX-2	P35354	Keap1	Q14145	közvetett	gátlás		15917255
humán	ENC1	O14682	NRF2	Q16236	közvetett	gátlás		19424503
humán	HDAC1	Q13547	NRF2	Q16236	közvetett	gátlás		18241676
humán	HDAC1	Q13547	MafK	O60675	közvetett	gátlás		18241676

humán	HDAC2	Q92769	NRF2	Q16236	közvetett	gátlás		18241676
humán	HDAC3	O15379	NRF2	Q16236	közvetett	gátlás		18241676
humán	Keap1	Q14145	GST A1	P08263	közvetett	gátlás		18476723
humán	Keap1	Q14145	Rac1	P63000	közvetett	gátlás		18476723
humán	MafG	O15525	Jun	P05412	közvetett	gátlás		12490281
humán	NRF2	Q16236	MUC5AC	P98088	közvetett	gátlás		20216230
humán	NRF2	Q16236	MCP-1	P13500	közvetett	gátlás		16246346
egér	NRF2	Q16236	SREBP-1c	B0I4X4	közvetett	gátlás		20677908
humán	NRF2	Q16236	VAMP-1	P23763	közvetett	gátlás		16246346
humán	p65 (NF-κB)	O00221	NRF2	Q16236	közvetett	gátlás		18241676
humán	SIRT1	Q96EB6	NRF2	Q16236	közvetett	gátlás		20623181
humán	YY1	P25490	CFTR	P13569	közvetett	gátlás		20309604
majom	CAND1	Q86VP6	NRF2	Q16236	közvetett	gátlás		16449638
humán	c-Src	P05480	NOX1	Q9Y5S8	közvetett	aktiválás		15774483
humán	CUL1	Q9JLV5	NRF2	Q16236	közvetett	aktiválás		17015834
humán	NOX1	Q9Y5S8	NRF2	Q16236	közvetett	aktiválás		20347035
humán	NOX1	Q9Y5S8	Trx1	P10599	közvetett	aktiválás		20347035
humán	NRF2	Q16236	CBR3	O75828	közvetett	aktiválás		20806931
egér	AhR	P30561	NRF2	Q16236	közvetett	aktiválás		21569840
egér	CAT	Q6IB77	NRF2	Q16236	közvetett	aktiválás		21569840
egér	CD36	P16671	NRF2	Q16236	közvetett	aktiválás		14752028
humán	COX-2	P35354	NRF2	Q16236	közvetett	aktiválás		15917255
humán	c-Src	P05480	NRF2	Q16236	közvetett	aktiválás		18802114
humán	EPO	P11678	NRF2	Q16236	közvetett	aktiválás		20229611
egér	FGF-20	Q9NP95	NRF2	Q16236	közvetett	aktiválás		16298938
humán	Jun	P05412	GCS-1	Q13724	közvetett	aktiválás		12490281
humán	KLF2	Q9Y5W3	NRF2	Q16236	közvetett	aktiválás		18467642

humán	MafF	Q9ULX9	GCS-1	Q13724	közvetett	aktiválás		12490281
humán	MafG	O15525	BACH1	Q9BX63	közvetett	aktiválás		21812759
humán	MT-III	P25713	NRF2	Q16236	közvetett	aktiválás		18554677
humán	MT-III	P25713	HO-1	P09601	közvetett	aktiválás		18554677
humán	NOX1	Q9Y5S8	NRF2	Q16236	közvetett	aktiválás		18802114
humán	NRF2	Q16236	MRP3	O15438	közvetett	aktiválás		19345732
humán	NRF2	Q16236	VEGF	P15692	közvetett	aktiválás		20185790
humán	NRF2	Q16236	UGT2B7	P16662	közvetett	aktiválás		18622263
egér	NRF2	Q16236	CD36	P16671	közvetett	aktiválás		14752028
humán	NRF2	Q16236	GCLM	P48507	közvetett	aktiválás		19808663
patkány	NRF2	Q16236	TR1	Q7RTX1	közvetett	aktiválás		16219762
humán	NRF2	Q16236	ABCC2	Q92887	közvetett	aktiválás		18038766
egér	NRF2	Q16236	A170	Q64337	közvetett	aktiválás		14752028
humán	NRF2	Q16236	IL-8	P10145	közvetett	aktiválás		16220540
humán	NRF2	Q16236	IkBa	P25963	közvetett	aktiválás		16246346
humán	p300 (CBP)	Q09472	TXAS	P24557	közvetett	aktiválás		14565864
humán	ProTα	?	NRF2	Q16236	közvetett	aktiválás		15657435
egér	Sp1	P08047	AhR	P30561	közvetett	aktiválás		21569840
humán	TNF	P01375	NRF2	Q16236	közvetett	aktiválás		18202225
humán	TNF	P01375	HO-1	P09601	közvetett	aktiválás		18202225
humán	Trx1	P10599	HIF-1α	Q9BYW2	közvetett	aktiválás		20347035
humán	VEGF	P15692	NRF2	Q16236	közvetett	aktiválás		22033923
humán	CAND1	Q86VP6	Keap1	Q14145	közvetett	aktiválás		16449638
humán	CBP	Q9NWQ8	MafK	O60675	közvetett	irányítatlan		18241676