B2964

A FOLLIKULÁRIS SEJTEK SZEREPE A MUSLICA PETÉK EREDETÉBEN: AZ *Apc* MUTÁCIÓ FEJLŐDÉSGENETIKAI JELLEMZÉSE

Doktori értekezés

Készítette: **Hoffmann Gyula**

Témavezető : **Dr. Szabad János**

Készült az MTA Szegedi Biológiai Központ

Genetikai Intézetének

fejlődésgenetikai csoportjában

Szeged, 1989

Köszönetemet szeretném kifejezni mindenekelőtt Dr. Szabad Jánosnak, aki munkámat minden szakaszában fáradhatatlanul és türelemmel segítette.

Köszönettel tartozom Erdélyi Miklósnak, aki sokirányú, hasznos támogatást nyújtott, Dr. Gausz Jánosnak és Závorszky Péternek a kézirat átolvasásáért és értékes megjegyzéseikért.

Papp Jánosnénak a technikai kivitelezésben, Nöllenburg Gabriellának a dolgozat végső formájának kialakításában nyújtott segitségéért ezúton mondok köszönetet. Köszönöm Dusha Bélának a fotókat.

Végül, de nem utolsó sorban köszönettel tartozom Bogár Ferencnek, Varga Tamásnak, Zsótér Andrásnak és Mészáros Lászlónak a gépelésben nyújtott segítségért, és a szövegszerkesztő programok biztosításáért.

SZEGED

TARTALOMJEGYZÉK

SUMMARY ?!!

Oldal

BEVEZETÉS 1

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK 7

A mutáns fenotípusának leírásához felhasznált módszerek 8

Vizsgálatok kimérákkal

a. Petefészek kimérák 8

b. Ivarsejt-vonal kimérák 9

Apc^{+}-klónok indukciója mitotikus rekombinációval 11

EREDMÉNYEK 12

Az Fs(3)Apc mutáció általános tulajdonságai 12

Az Fs(3)Apc fenotípusa 13

Az Apc mutáció fókusza

1. Petefészek kimérák 14

2. Csíravonal-kimérák 15

Az Apc mutáció genetikai térképezése 16

Az Apc mutáció jellege 17

A röntgensugárzás hatása az Apc/rucuca nőstényekre 17

A mutáns fenotípus menekítése röntgensugárzással 18

Oldal

AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA 24

Az Fs(3)Apc mutáció az oogenezis egyik specifikus lépését gátolja. 24

Az Apc mutáció természete 28

A follikuláris sejtek rokonsági viszonyai 31

Egy és sok 32

Apc^{+} klónok és a follikuláris sejtek származásviszonyai 33

Az Apc mutáció és a "domináns nőstény-steril technika" 36

IRODALOMJEGYZÉK 39

TÁBLÁZATOK

ÁBRÁK

BEVEZETÉS

A petesejtek, peték vagy tojások az oogenezis termékei. A muslica (Drosophila melanogaster) petéi két sejttípus összehangolt funkciójának az eredményei. Az ivarsejtvonal eredetű pete- és dajkasejtek főleg a peték **citoplazmájának** szintézisében, a mezodermális eredetű burkoló follikuláris sejtek elsősorban a peték védő rétegeinek képzéséért felelősek (1. ábra) (King, 1970; Gehring és mtsi.*, 1976; Mahowald és Kambysellis, 1980). Az ivarsejt-vonalat alkotó sejtek az embriók ú.n. sarki sejtjeiből származnak, melyek az embriogenezis második órájában képződnek. Néhány osztódás után egy részük a testüregbe vándorol, ahol mezodermális eredetű burok veszi őket körül: kialakul a petefészek kezdeménye (Bodenstein, 1950; Poulson, 1950; Gehring és mtsi., 1976). A petefészekkezdemények mindegyikét 5-7 ősivarsejt és néhány tucatnyi mezodermális eredetű sejt alkotja (Sonnenblick, 1950). Az ősivarsejtek a lárválís élet folyamán mitotikusan osztódnak, számuk a bábozódáskor 90-100-ra tehető (King, 1970; Wieschaus és Szabad, 1979).

Az adult petefészkek kialakulása a bábozódás után kezdődik. A mezodermális eredetű sejtek benőnek az ősivarsejtek közé és azt petefészkenként 16-18 petecsőre osztják (1. ábra). A petecsövek végét germáriumnak, a petevezetőkhöz csatlakozó részt pedig vitelláriumnak nevezik. A germáriumban alakulnak ki a petekezdemények, a vitelláriumban érnek meg a peték: szintetizálódnak és megfelelő helyen és formá-

---

*mtsi.=munkatársai

ban helyezkednek el a petesejtek citoplazma-anyagai.

A peték differenciálódása egy nappal a bábok kialakulása után kezdődik. Egy-egy germárium csúcsi része 2-3 mitotikusan osztódó, a sarki sejtekből leszármazott csírasejtet tartalmaz (Wieschaus és Szabad, 1979). Az utódsejtek egyike őscsírasejt marad, a másik petévé differenciálódik: belőle négy mitotikus osztódás után egy 16 sejtből álló sejtcsoport képződik. A 16 sejt egyike a petesejt, a további 15 dajkasejtként a petesejt "feltöltésében" játszik szerepet. A pete- és a dajkasejteket gyűrűcsatornák kötik össze. A dajkasejtek poliploidok. Bennük erős mRNS és fehérje szintézis folyik. (A petesejt genomja csaknem teljesen inaktív.) A dajkasejtek citoplazmája a gyűrűcsatornákon át a petesejtébe ömlik.

A 16 sejtet a germárium csúcsi régiójában kb. 80 mezodermális eredetű sejt veszi körül: megformálódik az egysejtrétegű follikuláris köpeny, kialakul egy petekezdemény. A pete- és a dajkasejtek térfogatának növekedésével egyidőben a follikuláris sejtek mitotikusan osztódnak, miközben számuk 80-ról 1200-ra nő. Rövidesen megkezdődik a follikuláris sejtek differenciálódása is. Míg a petesejt körül elhelyezkedők oszlopszerűen megnyúlnak, a dajkasejtek felületén elhelyezkedők ellaposodnak. Az ú.n. határsejtek, melyek speciális follikuláris sejtek, megkezdik vándorlásukat a pete elülső csúcsa felé a dajkasejtek között (2.a ábra). A határsejtek hamarosan elérik a dajkasejtek-petesejt határvonalat. Az elülső oszlopalakú follikuláris sejtek a pete- és az egyre kisebb dajkasejtek közé nyomulnak, mintegy "lelökik" a degeneráló-

dott dajkasejteket (2.b ábra).

A következő fázisban a follikuláris sejtek megkezdik a peték burkoló rétegeinek szintézisét: a belső vitellin hártyát és a külső koriont. A burkoló rétegek jellegzetes képződményei a hátoldali függelékek valamint a mikropílus, ahol a spermium behatol a petébe (2.c ábra; Margaritis és mtsi., 1980). Az időközben degenerálódott dajkasejtek a petesejt elülső végén már csak "sapkát" alkotnak. A dorzális függelékek benyúlnak a sapka alá és fölé. Közben a határsejtek kialakítják a mikropilust. Befejeződik a hátoldali függelékek fejlődése és kialakul az érett pete (2.c és 6. ábra).

A petesejtet védő héj 5 rétegű (3.ábra). Alkotói a következők:

1. A vitellin membrán amely rendezetlen részecskékből áll.
2. A viaszréteg; többrétegű hidrofób lemezek alkotják.
3. A belső koriont kristályos rácsozat alkotja (ICR).
4. A korion középső része rostos szerkezetű: az alsó és felső rostos lemezeket gerendázat tartja össze.
5. A külső réteg laza rostokból áll. Kétrétegű, a belső kevésbé tömör szerkezetű.

Az operkulum a pete elülső végén található lapos, fedőszerű képlet. Akkor játszik fontos szerepet, amikor a széle felreped és az így képződő résen "kikel" a lárva a petéből. Felületén - különösen a mikropílus körüli részen és a függelékek belépésénél - a sejtlenyomatok mintázata elüt a pete többi részétől.

A hátoldali korion függelékek, melyek valószínűleg az embrió oxigénellátásában játszanak fontos szerepet, 250 µm hosszúak, nagyobbrészt hengeres alakúak a végükön kissé lapítottak. Alapjuknál mért átmérőjük 15-20 µm. Sejtszerű mintázat csak alapjukhoz közel figyelhető meg.

Az oogenezisről szerzett ismeretek részben morfológiai leíráson (King és Mohler, 1975) részben genetikai analízisen, nőstény-steril mutációk vizsgálatán alapulnak (Konrad és mtsi., 1985). A follikuláris sejtek eredetét, fejlődését és funkcióját illetően ismereteink meglehetősen szerények. Nem ismerjük a follikuláris sejtek differenciációjának jellegzetességeit. Nem tudjuk, hogy a genom hányad része és milyen szerepet tölt be a follikuláris sejtek életében. Alig vannak ismereteink annak az információcserének a jellemzőiről, amely a pete- és a dajkasejtek valamint az őket burkoló follikuláris sejtek között lejátszódik. Csak nagyon keveset tudunk arról, hogy milyen szerepet töltenek be a follikuláris sejtek a petékben fejlődő embriók életében.

Az előző bekezdésben feltett kérdések egy része megválaszolható mutánsok vizsgálatával. Várhatóan nőstény-sterilitás a fenotípusa azoknak a mutációknak, amelyek olyan géneket azonosítanak, amelyeknek szerepe van a follikuláris sejtek életében (Wieschaus és mtsi., 1981; Konrad és mtsi., 1985; Galanopoulos és mtsi., 1989). Mi az MTA Szegedi Biológiai Központjában 75 domináns nőstény-steril mutációt (Fs) izoláltunk (Erdélyi és Szabad, 1989; Szabad és mtsi., 1989). Az Fs mutánsok mozaik analízise során derült arra fény, hogy

négyőjük (Fs(3)Apc, Fs(3)Avar, Fs(2)Ugra és Fs(2)Etre) a follikuláris sejtek funkcióját befolyásolva eredményez domináns nőstény-sterilitást. Mivel Fs(3)Apc jellegzetes mutáns fenotípust okoz, t.i. a peték elülső részének fejletlenségét, az Apc mutáció ígéretes eszköznek bizonyult néhány, a follikuláris sejtek funkciójára vonatkozó kérdés megválaszolására (Szabad és Hoffmann, 1989). Apc/+ sejtekben mitotikus rekombinációval +/+ sejteket indukáltunk, mintegy "megszabadítva" néhány follikuláris sejtet attól a "tehertől", melyet az Apc mutáció jelent. A +/+, immáron vadtípusúként viselkedő sejtek egy mozaik foltot alkotnak. E mozaik foltok, ha alkalmas méretűek és a follikuláris sejtek megfelelő részét alkotják, menekíthetik a mutáns fenotípust. Az Apc^{+} mozaik foltok vizsgálata alapján megállapítottuk, hogy az Apc mutáció a petekezdemények elülső follikuláris sejtjeinek funkcióját befolyásolja. A mutáns fenotípus úgy alakul ki, hogy elmarad vagy nem teljes a follikuláris sejtek benyomulása a pete- és a dajkasejtek közé a peték érésének egyik utolsó fázisában (King, 1970). A tökéletlen follikuláris sejt vándorlás miatt az operkulum és a hátoldali függelékek fejletlenek maradnak, ami miatt kiürül a petesejt elülső citoplazmájának egy része. Az Apc^{+} mozaik foltok vizsgálata azt is megmutatta, hogy legalábbis a petekezdemények kialakulásakor, a sejt-leszármazás szempontjából nem elkülönültek azok a sejtcsoportok, amelyek majdan a hátoldali függelékeket és az operkulumot képezik. Bizonyítottuk, hogy egy-egy hátoldali függelék képzésében több mint egy follikuláris sejt vesz részt

(Szabad és Hoffmann, 1989).

Dolgozatom az Fs(3)Apc mutáció jellemzőit és az Apc^{+} klónok vizsgálatán alapulva a follikuláris sejtek fejlődését írja le.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

A Drosophila törzseket 25°C-on, hagyományos körülmények között Drosophila táptalajon tartottuk (kukoricaliszt, cukor, agar és élesztő; Ashburner és Thompson, 1978).

Az Fs(3)Apc mutáció (továbbiakban Apc) a harmadik kromoszómához kapcsolt, etil-metán-szulfonáttal indukált domináns nőstény-steril (Fs) mutáció (Erdélyi és Szabad, 1989). Az Apc-ot hordozó kromoszóma az mwh és e marker-mutációkkal jelölt (mwh= multiple wing hairs; e= ebony, fekete test; Lindsley és Grell, 1968).

Az Apc mutációt egy olyan törzsben tartjuk fenn, amelyben T(1;3)OR60/TM3 nőstényeket Apc/TM3 hímekkel keresztezünk. A T(1;3)OR60 a hímek domináns letalitását okozó transzlokáció, a TM3 pedig egy, a meiotikus rekombinációkat kiküszöbölő, domináns marker-mutációkkal jelölt ú.n. balanszer kromoszóma (Lindsley és Grell, 1968).

A kísérletek túlnyomó részében Apc/rucuca genotípusú nőstényeket használtunk. (A rucuca egy nyolc recesszív marker-mutációt hordozó kromoszóma, amely letális mutációktól mentes és általában mutációk térképezésére használják.) Az Apc/rucuca nőstények rucuca nőstények és Apc/TM3 hímek keresztezéséből származtak.

Az Apc/+/+ genotípusú nőstényeket, amelyek az Apc mutációt és annak két vad alléljét hordozták Dp(3;3)/TM3 nőstények és Apc/TM3 hímek párosításából nyertünk. (A Dp(3;3) tandem duplikációt jelöl.)

A mutáns fenotípusának leírásához felhasznált módszerek

A peték fenotípusának leírásához petepreparátumokat készítettünk, olyan módszerrel, hogy a peteburok, a korion illetve annak függelékei épen maradjanak (Wieschaus és Nüsslein-Volhard 1986).

A petéket egy detergens (Na-dodecil-szulfát) 10 %-os oldatában mostuk, hogy a szennyeződéseket eltávolítsuk, majd 60°C-on ecetsav és glicerin 3:1 arányú keverékében 1 óra hosszat fixáltuk. A fixált petéket Hoyer reagens:tejsav 1:1 arányú elegyében fedtük le és egy napon át 60°C-on derítettük. Az íly módon előkészített petéket sötét látóterű, vagy fáziskontraszt mikroszkópban vizsgáltuk.

A petefészkeket kiboncoltuk, és 10^{-5} g/ml DAPI tartalmú Ringer oldatban lefedtük, majd fluoreszcens mikroszkópban vizsgáltuk. (A DAPI= diamino-fenil-indol egy DNS-hez kötődő, nagy fluoreszcencia hatásfokú festék; Handke-Kociok és Liebrich, 1986.)

Vizsgálatok kimérákkal

a. **Petefészek kimérák**

A nőstények fertilitása több szerv (petefészek, agy, zsírtest stb.) összehangolt funkciójának eredménye (King, 1970; Szabad és Fajszi, 1982). Bármelyik szerv hibás funkciója sterilitáshoz vezet.

Annak megállapítására, hogy az Apc mutáció fókusza a petefészekben vagy más szervben van-e, petefészek kimérákat állítottunk elő. Apc/rucuca genotípusú lárvákból petefészkeket boncoltunk ki és vékony üvegből készült tűvel +/Fs(1)K1237

genotípusú lárvákba ültettük át (Ephrussi és Beadle, 1936). Az Apc/rucuca lárvák rucuca/rucuca nőstények és Apc/CxD hímek keresztezéséből származtak. Mivel az Apc-ot hordozó és a rucuca kromoszóma is tartalmazza az e mutációt, de a CxD balanszer kromoszóma nem, az Apc/rucuca lárvákat könnyű volt elkülöníteni, mert légzőnyílásaik sötéten pigmentáltak. Az Fs(1)K1237 mutációt hordozó nőstények ősivarsejtjei degenerálódnak, de a mutáció a testi sejtek funkcióját nem érinti (Busson és mtsi., 1983; Perrimon, 1984). A K1237 mutációt hordozó ősivarsejtekből nem származnak peték. A kifejlődött, Apc/rucuca petefészket is hordozó kimérákat vizsgáltuk: raknak-e Apc típusú petéket, vagy sem. Ha igen, úgy az Apc mutáció a petefészek funkcióját befolyásolja. Ellenkező esetben az Apc fenotípus kialakulásáért a nőstények valamely más szerve felelős.

Egy második kísérletben ép petefészkeket (valójában az fs(1)K10 w mal marker-mutációkra homozigóta lárvák petefészkeit) transzplantáltuk Apc/rucuca lárvákba. Az fs(1)K10 recesszív ivarsejt-vonal függő, jellegzetes alakú petéket eredményező mutáció (Wieschaus és mtsi., 1978). A mal marker-mutációt hordozó petefészkek hisztokémiailag azonosíthatók: bennük inaktív az aldehid-oxidáz enzim (Janning, 1972). A donor lárvák homozigóták a white (w) marker-mutációra és színtelen Malpighi edényük miatt könnyen felismerhetők.

b. **Ivarsejt-vonal kimérák**

A petefészkeket ivarsejt-vonal és mezodermális eredetű,

főként follikuláris sejtek alkotják. Ivarsejt-vonal kimérák vizsgálatával eldönthető, hogy a tanulmányozott mutáció az ősivarsejtek vagy a mezodermális eredetű sejtek funkcióját befolyásolja-e. Az ivarsejt-vonal sejtek ősei, az ú.n. sarki sejtek az embriogenezis kezdetén jól felismerhetők, 15µm-nyi üvegtűvel összegyűjthetők, más embriókba átültethetők, csíravonal kimérák állíthatók elő (Lehmann és Nüsslein-Vollhard, 1986). Ha egy Apc/+ ivarsejtvonal sejteket és ép testi sejteket hordozó kiméra Apc típusú petéket rak, úgy arra következtethetünk, hogy az Apc mutáció az ivarsejtek funkcióját befolyásolja. Ellenben, ha a kimérák ép petéket raknak, úgy bizonyítottnak tekinthetjük, hogy az Apc mutáció a testi sejtek funkcióját befolyásolja.

Először rucuca/rucuca nőstények és Apc/TM3 hímek keresztezéséből származó embriók sarki sejtjeit ültettük át olyan embriókba, amelyek vad típusú nőstények és Fs(1)K1237/Y hímek keresztezéséből származtak. Egy embrióba csak egyféle típusú sarki sejteket transzplantáltunk. A kikelő nőstényeket rucuca/rucuca hímekkel párosítottuk. A kimérákat egyenként vizsgáltuk.

Egy második kísérletekben y v f mal homozigóta embriók sarki sejtjeit ültettük rucuca/rucuca nőstény és Apc/TM3 hím szülőktől származó embriókba. (y, v, f és mal recesszív marker-mutációk. Közülük csupán a mal bírt jelentőséggel kísérleteinkben.) A kifejlődő nőstényeket y v f mal hímekkel kereszteztük. A kimérák pete- és utódprodukcióját 14-16 napig figyeltük. Ezután petefészkeiket kiboncoltuk és hisztokémiai

lag festettük a mal homozigóta (nem festődő) petekezdemények kimutatásának céljából (Janning, 1972).

Apc$^+$ klónok indukciója mitotikus rekombinációval

Röntgensugárzás segítségével mitotikus rekombinációt indukálhatunk az Apc/+ petekezdeményekben az egyedfejlődés különböző szakaszaiban (4. ábra). A mitotikus rekombinációt követően képződő +/+ (=Apc$^+$) sejtek "megszabadulnak" az Apc mutáns alléltól, vadtípusúként viselkedve folytathatják fejlődésüket, "menekithetik" a mutáns fenotípust. Összességében tehát mitotikus rekombináció következtében Apc$^+$ mozaik foltok képződhetnek, melyek eredményeként várhatóan ép vagy közel ép peték fejlődhetnek, melyeket "kivételes" petéknek neveztünk.

Az Apc$^+$ klónokat Apc/rucuca genotípusú nőstényekben indukáltuk 1000 röntgen dózissal (150 kV; 0.5mm alumínimum szűrő; 500 R/min) az egyedfejlődés különböző stádiumaiban: blasztoderma, fiatal harmadik stádiumú lárva, fiatal báb és kifejlett adult (rendre 2,5-3,5; 70-74; 118-122; 348-372 órával az egyedfejlődés kezdete után). A kifejlődő nőstényeket egyenként 2-3 rucuca/rucuca hímmel kereszteztük és 11-30 napon át vizsgáltuk úgy, hogy őket naponta friss táptalajra helyeztük (Wieschaus és Szabad, 1979). Figyeltük a petehozamot és az Apc-tól eltérő alakú peték megjelenését. Utóbbiakat, ha belőlük lárvák nem keltek ki, összegyűjtöttük és mikroszkópikusan vizsgálatuk.

Eredményeinket statisztikai módszerekkel értékeltük.

EREDMÉNYEK

Az Fs(3)Apc mutáció általános tulajdonságai

Az Apc/+ nőstényektől, bármilyen genotípusú hímekkel párosítva őket, nem származnak utódok: Apc egy domináns nőstény-steril mutáció. Az Apc/+ nőstényektől származó peték kb. 0,2%-ában az embrionális fejlődés ugyan megindul de korai szakaszában elakad és szinte sohasem jut el a lárvális kutikula képződéséig.

A mutáció életképességet befolyásoló tulajdonságát meghatározandó Apc/TM3 hímeket kereszteztünk CxD/TM3 nőstényekkel. Ebből a keresztezésből 141 Apc/TM3 és 136 CxD/TM3 utód származott. A kontroll kísérletben, ahol mwh e/TM3 hímeket kereszteztünk CxD/TM3 nőstényekkel, 110 mwh e/TM3 és 103 CxD/TM3 utódot kaptunk. (Az Apc mutációt egy mwh e kromoszómán indukáltuk.) Mivel az Apc mutáció az utódok gyakoriságát nem befolyásolta ($P < 0,05$; χ^2 próba), arra következtettünk, hogy az Apc mutációnak a hordozók életképességére nincs hatása.

Egy domináns nőstény-steril mutáció jellemzéséhez tudnunk kell, hogy a mutáns fenotípus változik-e a genetikai háttér függvényében: ezért megvizsgáltuk a mutáció penetranciáját és expresszivitását. Mivel az Apc/TM3; Apc/CxD; Apc/+[1]; Apc/+[2]; Apc/rucuca és Apc/OR-60 nőstények mindegyike steril volt és a mutáns fenotípus sem függött a genetikai háttértől, arra következtettünk, hogy az Apc mutáció penetranciája és expresszivitása is (a nőstény-sterilitást illetően) 100%-os.

---

1 és 2= két különböző vadtípusú törzsből származó genetikai háttér.

Az Apc/TM3 genotípusú nőstények 10,8±8,8, míg a kontrollként vizsgált mwh e/TM3 nőstények 65,3±19,2 petét raktak naponta. (12-12 nőstény, 4 napon át). A két gyakoriság szignifikánsan különbözik ($P<0,01$; t-próba), jelezve, hogy az Apc mutáció csökkenti a hordozó nőstények petehozamát.

A petefészkek DAPI festésével kimutattuk, hogy a petekezdemények jelentős hányada degenerálódott. A degenerációt a dajka-sejtek magjainak piknotikus jellege mutatja, a kondenzálódott, szétesőfélben lévő kromatin (5. ábra).

Az Fs(3)Apc fenotípusa

Az Fs(3)Apc/+ genotípusú nőstények az ú.n. vadtípusútól eltérő alakú petéket raknak (6. ábra). A peték 95%-a a lerakás után összeesik, kiürül. Rajtuk a hátoldali korionfüggelékeknek csak a nyomai találhatók meg. A petéknek kb. 5%-a nem ürül ki. Rajtuk csak csökevényes függelékek figyelhetők meg. Az operkulum legtöbbször hiányzik. A mikropílus alatt nincsen gallérszerű képződmény. Ugyanakkor a pete felszínén a follikuláris sejtek határait jelző korion mintázat megfelel a vadtípusénak (6. ábra).

Mikroszkópos vizsgálataink megmutatták, hogy a vitellogenezist megelőzően a petekezdemények száma a vadtípuséval azonos. Az egy petekezdeményt burkoló follikuláris sejtek számában sem tapasztaltunk eltérést. A follikuláris sejtek vándorlása a petekezdemény felületén csak abban tér el a vadtípustól, hogy az elülső follikuláris sejtek benyomulása a pete- és a dajkasejtek közé nem vagy csak részlegesen történik

meg. A follikuláris sejtek hibás funkciója lehet a mutáns fenotípus oka: a petekezdeményekben a petesejtet védő rétegek és függelékek képződése a peték elülső részén nem, vagy csak részlegesen történik meg. Ez azt eredményezi, hogy a petesejt citoplazmájának egy része kiürül, elfolyik. Ezért a peték már kezdemény formájában degenerálódnak, vagy röviddel a lerakás után elvesztik alakjukat. Tehát az Apc mutáció az oogenezis egyik specifikus lépését, az elülső struktúrák kialakulását gátolja egy follikuláris sejtcsoport funkciójának megakadályozásával.

Az Apc mutáció fókusza

Egy mutáció fókuszán azt a szervet, szövetet, vagy sejtcsoportot értjük, amely funkcióját a mutáció befolyásolja. Az Apc mutáció fókuszát két lépésben határoztuk meg.

1. **Petefészek kimérák**

Amikor Apc/rucuca genotípusú lárvák petefészkeit transzplantáltuk +/K1237 lárvákba, a 11 kiméra mindegyike Apc fenotípusú petéket rakott. (1. táblázat).

A reciprok kísérletben, amikor ép (valójában K10 w mal homozigóta) lárvák petefészkeit ültettük Apc/rucuca lárvákba, a kimérák az Apc fenotípusú peték mellett a donorra jellemzőeket is raktak. A petefészek kimérák vizsgálata megmutatta, hogy az Apc mutáció a petefészek funkcióját befolyásolja és nincs hatással az egyéb testi szervekre, szövetekre: az Apc mutáció fókusza a petefészkekben van.

2. Csíravonal-kimérák

Csíravonal-kimérák vizsgálatával a mutáció fókusza tovább pontosítható. Eldönthető, hogy a mutáció a pete- és a dajkasejtek, vagy a petefészek mezodermális eredetű sejtjeinek funkcióját befolyásolja-e.

Először rucuca/rucuca nőstények és Apc/TM3 hímek keresztezéséből származó embriók sarki sejtjeit ültettük át +/K1237 embriókba (2.A táblázat). A 74 nőstény közül 24 volt kiméra. Valamennyiük normális alakú petéket rakott. A petékből lárvák keltek ki, majd adultokká fejlődtek.

A transzplantált sarki sejtek genotípusára a kikelő utódok fenotípusából következtettünk: 14 kiméra Apc/rucuca, 10 rucuca/TM3 sarki sejteket hordozott. Vagyis, az Apc mutációt hordozó ivarsejtvonal sejtekből utódok fejlődhetnek, amennyiben ép follikuláris sejtek veszik körül őket. Ez az eredmény azt jelzi, hogy az Apc mutáció fókusza nem lehet az ivarsejtvonal sejtekben.

A második kísérletben y v f mal/y v f mal genotípusú embriók sarki sejtjeit ültettük át Apc/rucuca vagy rucuca/TM3 embriókba. (2.B táblázat). A 37 rucuca/TM3 genotípusú, ú.n. belső kontrollként használható nőstény közül 10-től származtak y v f mal utódok. Az utódok 2-24%-a volt y v f mal. A 42 Apc/rucuca nőstény mindegyike kizárólag Apc fenotípusú petéket rakott. A kontrollban megfigyelt 10/37 arány alapján feltételezhetjük, hogy a 42 Apc/rucuca nőstény közül 11-12 hordozott y v f mal genotípusú ivarsejtvonal sejteket. Mégis, egyiküktől sem származtak y v f mal utódok. Ez az eredmény

azt jelzi, hogy az Apc mutáció fókusza a petefészkek mezodermális eredetű komponenseinek egyikében, valószínűleg a follikuláris sejtekben van.

Annak a 10 rucuca/TM3 kimérának, melyek y v f mal utódoknak is életet adtak 14-16 nap elteltével kiboncoltuk a petefészkeit és aldehid-oxidáz enzimaktivitás alapján megfestettük. Hetőjükben olyan petekezdeményeket azonosítottunk, amelyek nem festődtek, bennük a pete- és dajkasejtek mal homozigóták voltak. (E 7 kiméra utódai között fordultak elő legnagyobb gyakorisággal y v f mal utódok.)

A 42 Apc/rucuca genotípusú nőstény közül 7 tartalmazott nemfestődő petekezdeményeket (7. ábra). Bár a nemfestődő petekezdemények funkcióképes pete- és dajkasejteket tartalmaztak, mégsem fejlődtek ép petékké a petefészek Apc testi sejtjei miatt.

Az ebben a fejezetben leírt eredmények amellett szólnak, hogy az Apc típusú peték kialakulásáért a petefészek mezodermális eredetű sejtjei felelősek, nem pedig a pete- és a dajkasejtek.

Az Apc mutáció térképezése

Az Apc/rucuca ősivarsejteket tartalmazó kiméráktól rekombináns utódok is származtak. Mi az utódok közül nőstényeket izoláltunk, és vizsgáltuk: hordozzák az Apc mutációt vagy sem. A rekombinánsok analízise megmutatta, hogy az Apc mutáció a harmadik kromoszóma bal karján, a h és a th marker-mutációkkal határolt szakaszon lokalizálható. A különféle típu-

sú rekombinánsok sterilitása vagy fertilitása alapján térképeztük az Apc mutációt. Amint azt a 8. ábra mutatja, az Apc mutáció a h-th távolságot 68/18 arányban osztja. Tekintve, hogy a h és a th lokuszok helye 26,5 illetve 43,2 cM, az Apc mutáció helye 39,5 cM.

Az Apc mutáció jellege

A térképezési adatok ismeretében létre lehetett hozni Apc/+/+ nőstényeket, amelyek hordozták az Apc mutációt és annak vad alléljét, két kópiában. Mivel az Apc/+/+ nőstények ugyanolyan petéket raktak mint az Apc/+ nőstények, arra következtettünk, hogy az Apc mutáció neomorf típusú (Müller, 1932), a mutáns fenotípus "funkciónyerés" következménye.

A röntgensugárzás hatása az Apc/rucuca nőstényekre

Az Apc mutáció pontosabb fókuszáról információkat nyerhetünk, ha Apc/rucuca nőstényeket röntgensugárzásnak teszünk ki. Röntgensugárzás hatására mitotikus rekombináció játszódhat le (esetleg bekövetkezhet az Apc mutáció reverziója): olyan sejtek képződhetnek, melyek nem hordozzák az Apc mutációt. Ezek a sejtek részt vehetnek a peték képződésében és végeredményben olyan peték fejlődhetnek, melyek részlegesen vagy tökéletesen épek.

A fentiek alapján 413 adult nőstényt sugaraztunk be és vizsgáltunk legalább 28 napon át 10-es csoportokban. A 42 csoport közül 21-ből származtak utódok. Véletlenszerű klónindukciót feltételezve egy Poisson-eloszlás alapján megbecsül-

tük az Apc$^+$ klónok számát és azt 29-nek találtuk (3. táblázat). A mozaikosság gyakorisága 7% volt.

Az utódok közül véletlenszerűen 55 nőstényt választottunk ki. Közülük 23 fertilis volt. A további 32 jellegzetes Apc petéket rakott. Vagyis az Apc$^+$ klónok lehetővé teszik, hogy az Apc/+ ivarsejtekből utódok származzanak. Ez az eredmény megerősíti az ivarsejtvonal-kimérák esetében megfigyelteket: az Apc mutáció nem az ősivar-, hanem a petefészek mezodermális eredetű sejtjeinek funkcióját befolyásolja. Érdekes, hogy a besugárzott nőstények minden utódja a besugárzást követő 14. nap után lerakott petékből származott.

A mutáns fenotípus menekítése röntgensugárzással

A peték morfológiai bélyegeiért a follikuláris sejtek felelősek. Ezért, a mozaik (Apc/+ és +/+ follikuláris sejteket hordozó) peték morfológiájából következtethetünk a follikuláris sejtek genotípusára. Mozaik petéket úgy hoztunk létre, hogy az Apc allélt mitotikus rekombinációval bizonyos sejtekből eltávolíttottuk, Apc$^+$ klónokat indukáltunk. Amennyiben a besugárzást követően a peték alakja (elsősorban az operkulum és a hátoldali függelékek) akár részlegesen is helyreáll, úgy arra következtethetünk, hogy az Apc mutáció az elülső follikuláris sejtek funkcióját befolyásolja. A fenti cél érdekében Apc/rucuca embriókat, lárvákat, bábokat és adultokat sugaraztunk be, majd figyeltük a kifejlődő nőstények petéit. A részlegesen helyreállt morfológiájú petéket a továbbiakban "kivételes" petéknek nevezzük. A "kivételes" kategórián be-

lül megkülönböztetünk "heterogén" petéket, melyeknek egy, másfél, vagy két vékony hátoldali függelékük volt. Várható volt továbbá, hogy a "kivételes" peték némelyikében az embriogenezis, teljesen vagy esetleg csak részlegesen, de lejátszódik.

A mitotikus rekombinációval az egyedfejlődés különböző stádiumaiban indukált Apc$^+$ klónokból, a "kivételes" peték gyakoriságából és típusából következtetéseket reméltünk levonni az (1) Apc mutáció fókuszára, (2) a korionfüggeléket szintetizáló sejtek fejlődésbiológiai jellemzőire: csíravonal jellegére és determináltsági fokára.

A 374 kontroll, be nem sugárzott nőstény közül négy rakott "kivételes" petét, összesen 10-et (4.táblázat). Közülük 9 volt vad küllemű egy pedig egy átlagos méretű és egy csökevényes függeléket hordozott (6. ábra). A vad fenotípusúak közül kettőből kelt ki lárva.

A röntgensugárzás hatására a mozaikosság gyakorisága szignifikánsan nőtt ($P < 0,05$; χ^2 teszt) (4.táblázat). Az egyedfejlődés későbbi stádiumaiban indukált Apc$^+$ klónok gyakoribbak, ugyanakkor kisebbek mint az egyedfejlődés kezdetén indukáltak.

A blasztoderma stádiumú embriók besugárzásánál 8, a korai harmadik stádiumos lárváknál és fiatal báboknál 12, a felnőtt korban besugárzott állatoknál pedig 17 napnyi vizsgálat volt szükséges a mozaik nőstények legalább 95%-ának azonosításához (15. ábra és 4. táblázat).

Az adult nőstényként besugárzott 385 nőstény közül 119

(30,9%) volt mozaik. Közülük 76 (63.9%) egyenként csupán egy, 25 (21%) egyenként 2, 8 (6.7%) 3, 10 (11.9%) pedig több mint 3 "kivételes" petét rakott.

A várható gyakoriságokat, hogy t.i. hány nőstény hordozhatott 0, 1, 2 illetve ≥3 Apc klónt, egy Poisson-eloszlás alapján becsültük. A 266, mozaikosságot nem mutató nőstényt úgy tekintettük, hogy nem hordoztak Apc^+ klónt. A nullatalálatos kategória alapján úgy becsültük meg, hogy 98, 18 és 2-3 nőstény hordozott 1, 2 vagy ≥3 Apc^+ klónt (4. táblázat). Feltűnő, hogy mindössze 2-3 olyan nőstényre számíthatunk, amelyektől egyenként ≥3 "kivételes" pete származna, mégis 18 ilyen nőstényt figyeltünk meg. A különbség szignifikáns ($P<0,01$; χ^2 teszt).

Azokból az Apc^+ klónokból, amelyek a már kialakult petekezdemények follikuláris köpenyében képződnek, csupán egyetlen "kivételes" pete származhat. Valószínű, hogy a két "kivételes" petét rakó nőstények petéi két független, két petekezdemény follikuláris köpenyeiben képződött Apc^+ klónokat reprezentálnak. A független klónindukció alapján mindössze 2,4 olyan nőstényre számíthattunk volna, amelyektől egyenként három "kivételes" pete származott volna, és egyre sem, amelytől négy vagy több. Ezzel szemben 18 olyan nőstényt figyeltünk meg, amelyek egyenként ≥3 "kivételes" petét raktak (átlagban 5,4-et; 4. táblázat). Ez az eredmény azt jelenti, hogy vannak olyan Apc^+ klónok, amelyekből egynél több "kivételes" pete származik, léteznek őssejt típusú ú.n. prefollikuláris sejtek muslica nőstényekben.

Szoros összefüggést tapasztaltunk az Apc$^+$ klónok indukciójának időpontja és a "kivételes" peték morfológiája között: minél előbb történt a klónindukció, annál nagyobb volt a vadtípushoz hasonló "kivételes" peték aránya. Hasonlóan összefüggés mutatkozott a klónindukció időpontja és a "kivételes" peték "sorsa" között: minél előbb történt a klónindukció, annál nagyobb arányban keltek ki lárvák a "kivételes" petékből (6. táblázat).

A "kivételes" peték legtöbbje a vadtípushoz hasonló volt. A hátoldali függelékek morfológiája - különösen azoknál a petéknél, amelyek csak egyet hordoztak - változatos volt alak, méret és vastagság tekintetében. De a hátoldali függelékek különbözhetnek az olyan "kivételes" peték esetében is, amelyek két függeléket hordoztak. A "heterogén" peték (amelyeknek egy, másfél illetve két függelékük volt) aránya 7-8% (57/460) volt, amikor a klónokat lárvákban illetve fiatal bábokban indukáltuk. Felnőtt nőstények besugárzását követően ez az arány 17,6%-ra emelkedett (5. és 6. táblázat; 10. ábra).

Amíg a 41, egy függeléket hordozó "kivételes" pete közül mindössze 4-ből kelt ki lárva (9,7%) addig a 45 másfél függeléket hordozó közül már 13 (20,8%). Nyilvánvaló, hogy minél korábban történt az Apc$^+$ klónok indukciója, annál nagyobbak az Apc$^+$ klónok és annál nagyobb az esély a mutáns fenotípus menekítésére. Így érthető, hogy a normális alakú peték aránya, amelyekből utód is fejlődik nagyobb a lárva és a bábállapotban végzett besugárzást követően, mint a kifejlett nős-

tények esetében. Az eredmények a várakozásnak megfelelően alakultak. A lárvák és a bábok besugárzását követően a "kivételes" peték 92,6%-a vadtípusúnak tűnt és 90%-ukból lárvák keltek ki. Amikor kifejlett nőstényekben indukáltuk az Apc$^+$ klónokat, a "kivételes" peték 82,4%-a tűnt vadtípusúnak de csak 29,1%-ukból keltek ki lárvák. Érdekes, hogy amikor adult nőstényekben indukáltunk Apc$^+$ klónokat, a 119 mozaik nőstény közül 101-től származott egy vagy két "kivételes" pete és csak 21,6%-ukból kelt ki lárva. Sőt a ≥3 petét eredményező Apc$^+$ klónok esetében sem kelt ki lárva mindegyik petéből (5. és 6. táblázat).

Érdekes, hogy adult nőstények besugárzását követően a "kivételes" peték különböző típusai hasonló gyakorisággal képződtek, függetlenül attól, hogy egy, két vagy ≥3 "kivételes" petét eredményező Apc$^+$ klónból származtak-e (10. és 13. ábra; 5. táblázat). A 806 "kivételes" pete közül mindössze 16-ban fejlődtek majd pusztultak el az embriók a lárva-stádiumban (12. ábra). Egyetlen kivétellel a lárvális kutikulát olyan petékben figyeltük meg, amelyek két, a vadtípusú petékhez hasonló függelékeket hordoztak. A kivétel olyan pete volt, melynek csak egy függeléke képződött. Talán nem véletlen, hogy a hiányzó függelék oldalán a fejre jellemző képletek nem alakultak ki (12. ábra).

A "kivételes" peték megjelenésének időbeli lefolyását adult nőstények besugárzását követően a 10., lárvákra vonatkozólag pedig a 11. ábra mutatja. Az adult nőstények besugárzását követően az első "kivételes" pete átlagban a besugár-

zást követő 10-11. napon jelent meg (14. ábra). A "heterogén" peték 95%-ának azonosításához a besugárzást követően 14, a vadtípusúak esetében pedig csak 21 napra volt szükség, vagyis a nőstények a "heterogén" petéket összeségükben korábban rakják le mint a vadtípusúakat (15. ábra).

AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

Az Fs(3)Apc mutáció az oogenezis egyik specifikus lépését gátolja.

A muslica (Drosophila melanogaster) petekezdeményei szövettani szempontból kétféle sejttípusból erednek: a petesejt és ennek 15 testvérsejtje, a dajkasejtek, egyetlen ősivarsejtből differenciálódnak. A 16 ivarsejtvonal eredetű sejtet burkoló egyrétegű follikuláris köpeny pedig a mezodermából származik (King, 1970). A két sejttípus összehangolt funkciója eredményezi a peték kialakulását.

Az oogenezis egyik utolsó fázisában a follikuláris sejtek a petesejt elülső végén a pete- és a dajkasejtek közé nyomulnak: mintegy lelökik a már feleslegessé vált, kiürült dajkasejt maradványokat, mely sejtek citoplazmája korábban a petesejtbe ömlött. A petekezdemények elülső részét burkoló follikuláris sejtek hozzák létre a peték védőburkait, a vitellinmembránt és a koriont a jellegzetes függelékekkel (2. és 3. ábra; King, 1970). Az Fs(3)Apc domináns nőstény-steril mutáció részben vagy teljesen megakadályozza, hogy a follikuláris sejtek a pete- és a dajkasejtek közé nyomuljanak. A mutáns fenotípus a follikuláris sejtek hibás funkciójának következménye. A védőrétegek részleges vagy teljes hiányának következtében a citoplazma egy része kiürül és emiatt a petekezdemények 3/4-e degenerálódik, felszívódik (5. ábra), a lerakott peték döntő többsége pedig összeesett, üres. Az elülső follikuláris sejtek hibás funkciója miatt csökevényesek a

korion-függelékek és a peték elülső pólusát borító struktúrák (6. ábra).

Fontos kérdés: hol, melyik szervben, sejtcsoportban fejti ki hatását az Apc mutáció, hol van a fókusza.

A petefészek-kimérák vizsgálata megmutatta, hogy a mutáció fókusza a petefészekben van. Az ivarsejt-vonal kimérák vizsgálatának eredményei amellett szólnak, hogy az Apc fenotípusú peték abnormális fejlődéséért a petefészek mezodermális eredetű sejtjei a felelősek.

Az Apc/+ heterozigóta nőstények besugárzását követően a peték egy részének az elülső burkoló rétegei és a hátoldali függelékek is részlegesen vagy teljesen vadtípusúak voltak. (Ezeket a peték neveztük "kivételes" peteknek; 9. ábra.) A mutáns fenotípus menekítését valószínűleg azok az Apc^+ klónok teszik lehetővé, melyek a röntgensugár-indukálta mitotikus rekombináció következtében jöttek létre. Az a megfigyelés, hogy a besugárzott Apc nőstényektől származnak "kivételes" peték, melyek elülső részének morfológiája az Apc mutáns és az ép peték közötti, bizonyíték arra, hogy a mutáció a follikuláris sejtek funkcióját változtatja meg: az Apc fenotípus a follikuláris sejtek genotípusától függ. Sajnos, olyan marker mutációk, amelyek segítségével az Apc^+ klónokat a peték felületén felismerhetnénk, nem ismertek, így az egyetlen lehetőség az Apc^+ klónok kimutatására a dorzális függelékek megfigyelésén alapul.

Pusztán a mutáns fenotípusból nem következik egyértelműen, hogy hol van a mutáció fókusza. Több olyan recesszív nős-

tény-steril mutáció ismeretes, amelyek fókusza bár a petesejtben van, mégis a follikuláris sejtek funkcióját befolyásolják (Wieschaus és mtsi., 1978; 1981; Perrimon és Gans, 1983; Galanopoulos és mtsi., 1989). Így pl. az olyan petekezdeményekből, amelyek pete- és dajkasejtjei homozigóták az fs(1)K10 mutációra míg a follikuláris köpeny sejtjei vadtípusúak, olyan peték fejlődtek, melyeknek a szokásos kettővel szemben négy hátoldali függelékük van, mintha két háti oldaluk képződött volna. Fordítva, az olyan petekezdeményekből, melyeknek ivarsejt-vonala vadtípusú, de a follikuláris köpenye fs(1)K10 homozigóta, ép peték származnak. Ez az eredmény azt jelzi, hogy bár a hátoldali függelékek a follikuláris sejtek termékei, a döntő szerepet legalábbis a K10 gént illetően az ivarsejt-vonal eredetű sejtek játsszák (Wieschaus és mtsi., 1978). Érdekes, hogy a K10 petékben ú.n. "csupahát" embriók fejlődnek, jelezve, hogy a peték és az embriók hasi-háti koordinátáit ugyanazok a gének határozzák meg (Wieschaus, 1980).

Az fs(2)gurken (grk) mutációra homozigóta nőstényeknek ú.n. "csupahas" petéi fejlődnek, melyeknek nincsenek hátoldali függelékeik és a korion sejt-mintázat is "csupahas" jellegű. A grk petékben "csupahas" típusú embriók fejlődnek és elpusztulnak (Schüpbach, 1987). Bár a grk mutáció fókusza éppen úgy, mint az fs(1)K10-é, a pete- és a dajkasejtekben van, mégis hatással van a follikuláris sejtekre, amint azt a peték korion-mintázata mutatja.

Galanopoulos és mtsi. (1989) nyolc olyan recesszív nős-

tény-steril mutáció fókuszát határozták meg, amelyek fejletlen, hiányos vitellin hártya és korion szintézis révén okoznak sterilitást. A mozaik peték vizsgálata megmutatta, hogy egyetlen kivétellel a mutációk olyan géneket azonosítottak, amelyek funkciójára az ivarsejtvonal eredetű sejtekben van szükség.

Az előzőekben összefoglalt eredmények azt jelzik, hogy a peték kialakulása a két sejttípus összehangolt funkciójának az eredménye. A pete- és a dajkasejtek valamint a follikuláris köpeny sejtjei közötti információcsere molekuláris alapjairól semmit sem tudunk. Bizonyosnak látszik azonban, hogy a sejtek közötti információcserében döntő szerepet az ivarsejtvonal eredetű sejtek játsszák.

Az alábbi tények, amellett szólnak, hogy Apc mutáció csak az elülső follikuláris sejtek funkcióját befolyásolja:

1. A follikuláris sejtek száma és vándorlása petekezdemények korai fejlődési stádiumaiban nem tér el a vadtípusútól.

2. Az elülső rész kivételével a korion mintázata megfelel a vadtípusúnak.

3. Két további follikuláris sejt-függő domináns nőstény-steril mutáció (Fs(2)Ugra és Fs(2)Etre) esetében, melyek a külső korion réteg egészének kialakulását zavarják, a mutáns fenotípus röntgensugárzással nagyságrenddel kisebb %-ban menekíthető, mint azt az Apc mutáció esetében láttuk. (Például amíg a röntgensugárzás menekítő hatása az Apc mutáció esetében 30,9 az Ugrá-nál midössze 1,3%; Szabad és mtsi., 1989).

4. Néhány "kivételes" petében olyan embriók képződtek, amelyeknél a feji struktúrák hiányosan fejlettek és a szegmentáció sem tökéletes (12. ábra). Ugyanilyen típusú rendellenességek tapasztalhatók az olyan vadtípusú embrióknál, amelyek olyan petében fejlődtek, amelyek elülső részéből a citoplazma egy részét eltávolították (Frohnhöfer és mtsi., 1986). Az olyan anyai hatású mutációk esetében, amelyeknél a peték elülső citoplazmáját szervező központok nem kielégítően működnek, szintén a feji struktúrák hiányos fejlődése figyelhető meg. Ilyen mutációk a bicoid (Frohnhöfer és Nüsslein-Vollhard, 1986), a swallow (Perrimon és mtsi., 1986), az exuperantia (Schüpbach és Wieschhaus, 1986). Úgy gondoljuk, hogy a "kivételes" petékben kifejlődött embriók feji rendellenességei az elülső citoplazma elfolyásának, kiürülésének következménye.

Az Apc mutáció természete

Minthogy az Apc mutáció sem a hordozók életképességét sem a hímek fertilitását nem befolyásolja, úgy gondoljuk, hogy az Apc mutáció olyan gén funkcióját érinti, amely a nőstényekben, az oogenezis során játszik szerepet. A "hagyományos" genetikai megközelítés ú.n. funkcióvesztéses típusú, többnyire recesszív mutációk vizsgálata során következtet a gén funkciójára. Nem ismerjük az Apc gén funkcióvesztéssel járó alléljait ill. az azokkal kapcsolatos mutáns fenotípust. Sikertelenek voltak azok a kíséletek, amelyekben az Apc mutáció revertánsait, a remény szerint "funkcióveszté-

ses" allélokat igyekeztünk előállítani. Annak ellenére, hogy 2938 etil-metán-szulfonát és 3730 röntgensugárzással kezelt, az Apc mutációt hordozó kromoszómát vizsgáltunk meg. (A domináns nőstény-steril mutációk reverziójának átlagos gyakorisága kb. 1/300; Erdélyi és Szabad, 1989; Szabad és mtsi., 1989)

Az Apc mutácó természetét meghatározandó volt szükség a mutáció helyének meghatározására. Mivel (1) a muslica hímekben nem játszódik le rekombináció a meiózis folyamán és (2) az Apc/+ nőstények sterilek, új megoldást kellett kidolgozni a mutáció térképezésére. Az Apc mutációt annak alapján térképeztük, hogy az Apc/+ ivarsejtvonal-sejtekből származnak utódok, amennyiben ép follikuláris sejtek burkolják őket: Az Apc/rucuca ivarsejteket hordozó kiméráktól rekombináns nőstényeket gyűjtöttünk, és az ő vizsgálatuk alapján az Apc mutációt a harmadik kromoszómára, a 39,5cM-al jellemzett helyre lokalizáltuk (Szabad és Hoffmann, 1989).

Az Apc mutáció helyének ismeretében olyan nőstényeket állítottunk elő, amelyek az Apc mutációt és annak vad allélját hordozták két kópiában (Apc/+/+ nőstények). Minthogy a mutáns fenotípus azonos volt az Apc/+ és az Apc/+/+ nőstények esetében, arra következtettünk, hogy az Apc mutáció ú.n. neomorf típusú (Müller, 1932): a mutáns fenotípus független a vad allélok számától. A neomorf jelleg azt is jelenti, hogy az Apc mutáció funkciónyeréses típusú, ugyanúgy mint az Fs mutációk döntő többsége (Erdélyi és Szabad, 1989; Szabad és mtsi., 1989).

Az eddig molekulárisan jellemzett három Fs mutáció is funkciónyeréses típusú.

A Toll gén egy receptorfehérjét kódol, amely része a petesejt külső membránjának. Ligandja valószínűleg az easter és/vagy a snake gének által kódolt fehérje (Hashimoto és mtsi., 1988). Domináns alléljai olyan, a receptorrészt érintő pontmutációk eredményei, amelyek a Toll-receptor molekulájának a ligand jelenlététől független aktivációját okozzák. A Toll mutáns fehérjék aktivitása más gének ektopikus kifejeződéséhez vezet, és ennek következménye a mutáns fenotípus, a "csupahas" embriók képződése. A Toll gén funkcióvesztéses recesszív alléljaira homozigóta nőstényektől "csupahát" embriók származnak, melyeknek nincs hasi oldala.

Az easter gén egy szerin-proteáz aktivitású fehérjét kódol. A funkcióvesztéses allélokra homozigóta nőstényektől "csupahát" embriók származnak. A domináns, funkciónyeréses allélok esetében viszont "csupahas" embriók képződnek. Az easter domináns allélok molekuláris szintű vizsgálata mutatta meg, hogy a funkciónyerés allélok pontmutációk eredményei: a mutáns géntermék ligandtól függetlenül aktiválódik. Az ektopikus easter aktivitás más gének kifejeződéséhez és végeredményben "csupahas" embriók képződéséhez vezet (DeLotto és Spierer, 1986; Chasan és Anderson, 1989).

A torso gén terméke membránhoz kötött fehérje (Sprenger és mtsi., 1989). Karboxil-csoport felőli része a citoplazmába épül és tirozin-kináz aktivitással rendelkezik. N-terminális része sejten kívüli receptor. Ligandja a torsolike

fehérje, amely a follikuláris sejtekben szintetizálódik (M. Klingler személyes közlése). A torso gén funkcióvesztéses alléljainak bármelyikére homozigóta nőstényektől olyan embriók származnak, melyeknek nem képződnek terminális végeik (Schüpbach és Wieschaus, 1986; Klingler és mtsi., 1988; Sprenger és mtsi., 1989; Strecker és mtsi., 1989). A funkcionyeréses, domináns allélok esetében viszont "csupavég" embriók fejlődnek, amelyek elpusztulnak (Klinger és mtsi., 1988; Szabad és mtsi., 1989). A torso domináns allél molekuláris szintű vizsgálata megmutatta, hogy a változás egyetlen aminósavcsere következménye. Az aminósavcsere a torso-fehérje receptor részét érinti és a receptor ektopikus aktivációját idézi elő (C. Nüsslein-Vollhard személyes közlése).

A follikuláris sejtek rokonsági viszonyai

Az Apc mutációt eddig leírt sajátságai alkalmassá teszik arra, hogy megismerjük a follikuláris sejtek leszármazási viszonyait. Röntgensugárzással mitotikus rekombinációt indukáltunk Apc/+ sejtekben. A mitotikus rekombináció nyomán az Apc mutációtól mentes +/+ (=Apc^+) follikuláris sejtek képződnek. Az Apc^+ follikuláris sejteket (is) tartalmazó petekezdeményekből teljesen vagy részben ép peték származhatnak (melyeket "kivételes" petéknek neveztünk). Az Apc^+ klónokat az egyedfejlődés különböző stádiumaiban indukáltuk, majd a kifejlődő adult nőstényeket vizsgáltuk, pontosabban az ő "kivételes" pete-produkciójukat.

Egy és sok

Az adultként besugárzott nőstények 31%-a rakott "kivételes" peté(ke)t. A mozaikok 85%-ától nőstényenként mindössze egyetlen "kivételes" pete származott. Valószínű, hogy az egy petéből álló klónok döntő többsége a már kialakult petekezdemények follikuláris köpenyében indukálódott Apc$^+$ klónokat reprezentálta. E feltételezést támasztja alá az a megfigyelés is, hogy az egy "kivételes" petéből álló klónok a besugárzást követő 10-11. napon bukkantak fel. Mint ismeretes, egy petekezdemény kialakulása és érése mintegy 11-13 napot vesz igénybe (Wieschaus és Szabad, 1979).

Érdekes, hogy bár az egy petekezdemény follikuláris köpenyét alkotó sejtek mitotikusan osztódnak a peték érése folyamán (miközben számuk a kezdeti 80-ról 1200-ra nő) és így Apc$^+$-klónok kialakulására van lehetőség, semmilyen jelét nem tapasztaltuk a petekezdemények érése során képződő Apc$^+$ klónoknak. Az ilyen típusú klónokat várhatóan a besugárzást követő néhány napon belül megjelenő "rendkívüli" peték reprezentálnák. Annak, hogy a peték érésének kései szakaszaiban képződő Apc$^+$ klónok nem mutathatók ki, két oka lehetséges. 1. Az anyasejttől öröklött Apc mutáns géntermék perduranciája (Garcia-Bellido és Merriam, 1971) megakadályozhatja a +/+, nem mutáns státusú sejtek vad fenotípusának megnyilvánulását. 2. A +/+ sejtek részleges autonómiája is megakadályozhatja a mindössze néhány sejtből álló Apc$^+$ klónok kifejlődését: az Apc$^+$ sejtekből Apc mutáns géntermék diffundálhat a +/+ sejtekbe (Garcia-Bellido, 1972).

A kifejlett nőstények kb.15%-a nem egy, hanem 3 vagy több "kivételes" petét rakott. Mivel nagyon valószínűtlen, hogy ezen peték mindegyike független Apc$^+$ klónokból származott, feltételezhetjük, hogy a ≥3 "kivételes" petét rakó nőstények Apc$^+$ prefollikuláris sejteket tartalmaztak. Az Apc$^+$ prefollikuláris sejtek csírasejtekként osztódtak és utódjaik több petekezdemény follikuláris rétegének képződéséhez járultak hozzá. Így származhatott ≥3 "kivételes" pete egyetlen Apc$^+$ klónból. A prefollikuláris csírasejtekből származó "kivételes" peték, amint az várható, az Apc$^+$ klónok indukcióját követő 9-11. naptól kezdve jelentek meg folyamatosan a nőstények életének hátralevő heteiben. Többnyire épek voltak és belőlük lárvák keltek ki. A csírasejt jellegű follikuláris sejtek létezését bár korábban már King (1970) feltételezte, mi mutattuk ki őket elŏször.

Apc$^+$ klónok és a follikuláris sejtek származásviszonyai

A felnőtt nőstények "egyke" Apc$^+$ klónjaiból származó peték 82,4%-a 2 ép hátoldali függeléket hordott. Ebből következik, hogy a két függeléket képező sejtek egységes sejtvonalat alkotnak a follikuláris köpeny kialakulásakor; közös úton fejlődtek és egyenértékűek. Ha ez nem igy lenne, úgy csak olyan "kivételes" peték képződnének, melyeknek egyenként csak egy hátoldali függelékük volna.

Megfigyeltük, hogy a felnőttként besugárzott nőstények petéi között 17,6%-ban voltak olyanok is, amelyeknek a függelékei rövidebbek és vékonyabbak voltak, mint a vadtípusúaké

("heterogén" peték). A "heterogén" peték puszta létezése döntő érv amellett, hogy a függelékek szintézisében több sejt is részt vesz. Ha csak egy sejt lenne érdekelt, a függelékek a "minden vagy semmi" elv alapján vagy épek lennének, vagy meg sem jelennének.

Korábbi vizsgálatok (King, 1970; Margaritis, 1985) szerint a vadtípusnál a korion függelékeit és az operkulumot 3, egyenként 80-120 sejtből álló, mozgásban levő follikuláris sejtcsoport hozza létre. Mivel megfelelő marker-mutáció nem állt rendelkezésünkre, az Apc$^+$ klónok határait nem tudtuk meghatározni. Így azt sem, hogy 1. vajon a "heterogén" peték hátoldali függelékeit milyen mértékben alkotják az Apc és az Apc$^+$ follikuláris sejtek termékei és 2. mennyi a háti függelékek kialakításában résztvevő sejtek száma.

A follikuláris klónokból származó "kivételes" peték egy részében lezajlott az embriogenezis és 21,6%-ukból lárvák keltek ki (5. táblázat). Ez az eredmény azt jelenti, hogy a follikuláris köpeny kialakulása idején az Apc sejtek utódaiból normálisan fejlett operkulum és gallér is keletkezhet. Tehát az összes elülső függelék képződéséért felelős follikuláris sejtek egyetlen sejtvonalba tartoznak, legalábbis a petekezdemények kialakulásakor.

Több kutatócsoportnak sikerült a follikuláris sejtek funkcióját érintő mutációk klónjait a pete felületén kimutatni (Wieschaus és mtsi., 1981; Perrimon és Gans, 1983). Ha az ismert recesszív nőstény-steril mutációk közül találtunk volna olyat, amely homozigóta állapotban a pete felületén látha-

tó változást okoz és az Apc mutációhoz hasonlóan a 3. kromoszóma bal karján helyezkedik el, az Apc$^+$ klónok határait ennek segítségével detektálni tudnánk. Mivel ilyen mutáció nem állt rendelkezésre, a follikuláris klónok kialakulása után kialakuló további sejtvonalbeli kötöttségek a pete elülső részének szintéziséért felelős follikuláris sejtek között felderítetlenek maradtak.

Lárva állapotban a petefészek mezodermális eredetű sejtjei még nem differenciálódtak szövettanilag még egységesek; a késői lárva/korai bábállapotig osztódnak és csak akkor kezdenek differenciálódni (Bodenstein, 1950; King, 1970). Várható, hogy a lárvaállapotban indukált Apc$^+$ klónok kevésbé gyakoriak, de nagyobbak lesznek, mint a felnőtt nőstények besugárzásakor megfigyeltek. Várható továbbá, hogy

1. a lárvális/korai báb állapotban indukált klónok néhány napon belül felbukkannak
2. több, a vadtípusúhozhoz hasonló típusú pete képződik
3. a peték nagyobb százalékából kelnek ki lárvák, mint azt a felnőtt nőstények besugárzását követően tapasztaltuk

Valóban, a lárva állapotban végzett besugárzást követően a mozaik nőstények az első "kivételes" petéiket átlagban az 5,7 nap után rakták le (szemben az adultként besugárzott nőstényeknél tapasztalt 10,7 nappal), petéik nagyobb arányban voltak vadtípusúak, belőlük nagyobb arányban keltek ki lárvák, mint az adult besugárzás esetén. Tehát eredményeink az elvárásokat megerősítették, jelezve azt is, hogy a "kivéte-

les" peték valóban Apc$^+$ klónkat reprezentálnak.

Érdekes, hogy a lárvákban és a fiatal bábokban indukált Apc$^+$ klónok több mint 50%-ából egyenként mindössze egy "kivételes" pete származott. Ezt a megfigyelést úgy magyarázzuk, hogy az Apc$^+$ klónok nem válnak részévé a germárium prefollikuláris sejtjeinek, hanem csupán egyetlen petekezdemény follikuláris köpenyéhez járulnak hozzá. Valószínű, hogy amikor a mezodermális eredetű sejtek benőnek a differenciálatlan ősivarsejtek közé, és kialakulnak a petecsövek, azokból az ősivarsejtekből, amelyek a petecsövek alsóbb részeiben helyezkednek el, egyenként csupán egy pete differenciálódik (Wieschaus és Szabad, 1979). Azok az Apc$^+$ klónok, amelyek egy-egy "közvetlenül" petévé fejlődő ősivarsejtek közelében voltak, így csupán egyetlen "kivételes" pete képződéséhez járulnak hozzá (Szabad és Hoffmann, 1989).

Az Apc mutáció és a "domináns nőstény-steril technika"

Az Apc mutáció alkalmas eszköz lehet arra, hogy megvizsgáljuk: érintik-e bizonyos recesszív nőstény-steril (fs) vagy zigotikus letális (l) mutációk az elülső follikuláris sejtek funkcióját. Az fs/+ vagy l/+ heterozigóta follikuláris sejtek mitotikus rekombináció után fs/fs vagy l/l homozigótává válhatnak (16. ábra). Ezután tanulmányozható, hogy van-e hatása az fs vagy l mutációnak a follikuláris sejtek életére.

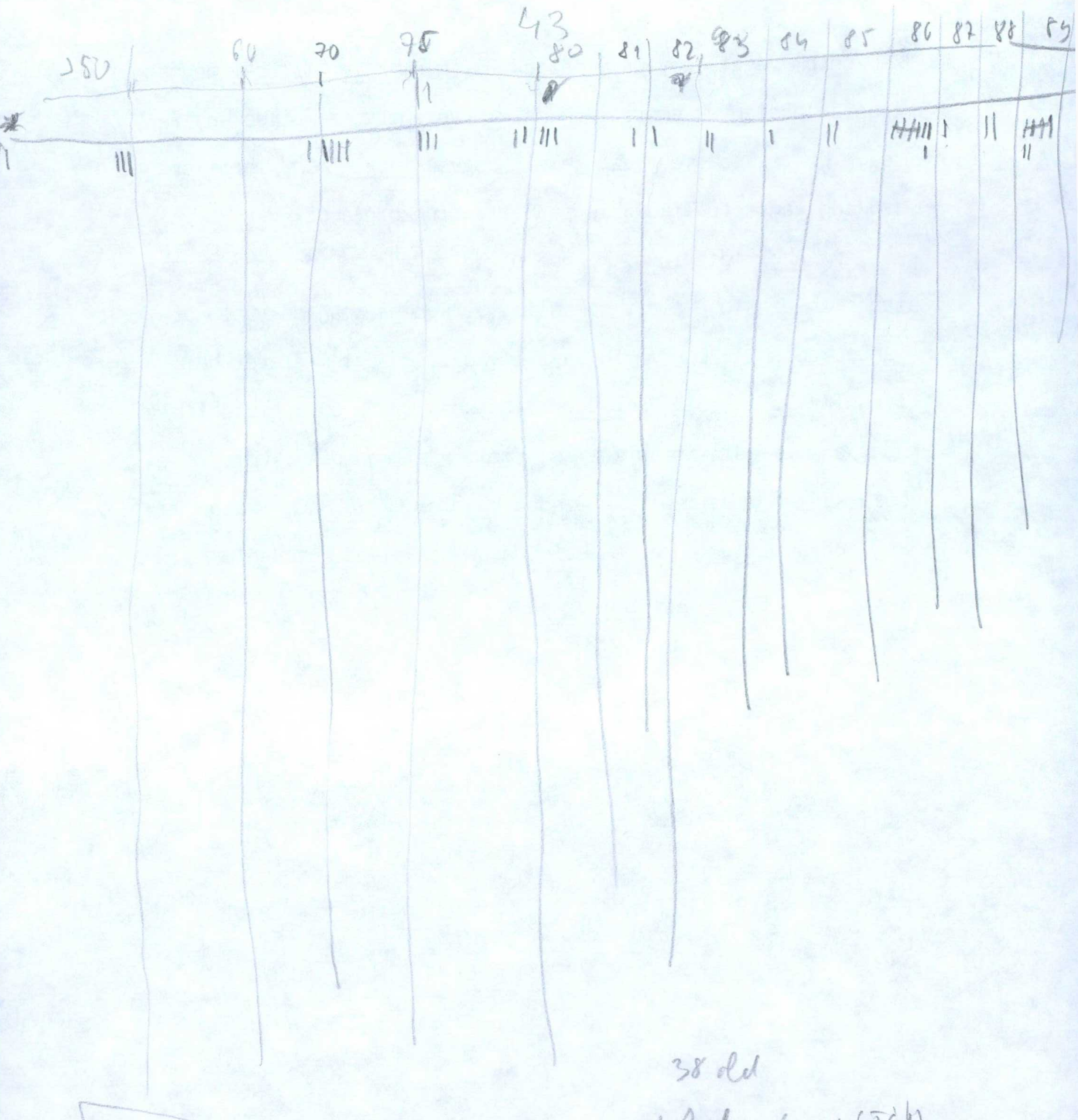
Az fs/fs vagy l/l klónokat hordozó peték nehezen vagy egyáltalán nem különíthetők el azoktól, melyek follikuláris

sejtjei fs/+ (vagy l/+) heterozigóták. Az Fs(3)Apc mutáció segít a fenti probléma megoldásában: az Apc mutációt hordozó sejtekből nem származnak peték. A mitotikus rekombinációt követően képződő fs/fs vagy l/l sejtek viszont nem hordozzák az Apc mutációt, és amennyiben az fs vagy l mutációk a follikuláris sejtek életére nincsenek hatással, belőlük peték fejlődhetnek (16. ábra). Vagyis a domináns nőstény-steril mutáció mintegy szűrőként csak azokat a sejteket "engedi át", amelyeket tanulmányozni kívánunk. Az itt leírt megoldást nevezik domináns nőstény-steril technikának (Wieschaus, 1980; Perrimon és Gans, 1983).

Éppen az Apc mutáció segítségével sikerült bebizonyítani, hogy a torsolike (tor-l) gén (mely terméke a torso fehérje ligandja) a follikuláris sejtek életében játszik fontos szerepet. Amikor tor-l/Apc sejtekben indukáltak mitotikus rekombinációt, olyan petekezdemények képződtek, melyek follikuláris sejtjei (vagy egy részük) nem hordozták az Apc mutációt, de homozigóták voltak a tor-l mutációra. Ha a tor-l mutáció nem befolyásolná a follikuláris sejtek életét, (a tor-l génnek nem volna szerepe a follikuláris sejtek életében) úgy a legtöbb Apc mutációt nem hordozó follikuláris sejteket tartalmazó mozaik petekezdeményből peték, majd utódok származhatnának. Ellenben a tor-l mutáció befolyásolja a follikuláris sejtek funkcióját, úgy a "kivételes" petékben a torso-like mutáns fenotípust mutató embriók fejlődnek. Az eredmények azt mutatták, hogy a mozaik petekezdeményekből, bár ép peték származtak, de a bennük fejlődő embrióknak nem

képződtek végei; ugyanúgy néztek ki, mint a tor-1/tor-1 homozigóta nőstények embriói (Nüsslein-Vollhard személyes közlése). Ez az eredmény azt jelzi, hogy a tor-1 gén termékére szükség van a follikuláris sejtek ép funkciójához.

Az Apc mutációval minden olyan fs és l mutáció könnyen tanulmányozható, amely a muslica 3. kromoszómájának bal karjához kapcsolt. Egy másik, a follikuláris sejtek életét befolyásoló Fs mutáció (Fs(2)Ugra) azoknak az fs és l mutációknak a vizsgálatára alkalmas, amelyek a második kromoszóma bal karján lokalizáltak (Szabad és mtsi., 1989; J. Szabad és P.J. Bryant, K. Konrad és L.I. Marsh személyes közlése).



>50 : 5
51-70 : 1
71-75 : 7
76-80 : 5
81-85 : 5
86-89 : 18

38 old
+ [illegible] (4) : 6 tábl.
16 ÁBRA
[illegible]
jöm.
11
diagr.

IRODALOMJEGYZÉK

ASHBURNER, M., J.N. THOMPSON, Jr., 1978 A laboratory culture of Drosophila. In "The Genetics and Biology of Drosophila", Vol. 2A (M. Ashburner and T.R.F. Wright eds.) pp. 2-81, Acad. Press, New York.

BODENSTEIN, D., 1950 The postembryonic development of Drosophila. In "Biology of Drosophila" (M. Demerec, ed.), pp. 275-367.

BUSSON, D., M. GANS, K. KOMITOPOULOU and M. MASSON, 1983 Genetic analysis of three dominant female-sterile mutations located on the X chromosome of Drosophila melanogaster. Genetics **105**: 309-325.

CHASAN, R. and K.V. ANDERSON, 1989, The role of easter, an apparent serine protease, in organizing the dorsal-ventral pattern of the Drosophila embryo. Cell **56**: 391-400.

DELOTTO, R. and P. SPIERER, 1986 A gene required for the specification of the dorsal-ventral pattern in Drosophila appears to encode a serin protease. Nature **323**: 688-692.

EPHRUSSI, B. and G. W. BEADLE, 1936 A technique of transplantation of Drosophila. Amer. Nat. **70**: 218-225

ERDÉLYI, M. and J. SZABAD, 1989 Isolation and characterization of dominant female-sterile mutations of Drosophila melanogaster. I. Mutations on the third chromosome. Genetics **122**: 111-127.

FROHNHÖFER, H.G. and C. NÜSSLEIN-VOLHARD, 1986 Organization of anterior pattern in the Drosophila embryo by the maternal gene biocid. Nature **324**: 120-125.

FROHNHÖFER, H.G., R. LEHMANN and C. NÜSSLEIN-VOLHARD, 1986 Manipulating the anterior-posterior pattern of the Drosophila embryo. J. Embryol. Exp. Morphol. **97**: 169-179.

GALANOPOULOS, V.K., W. ORR, J. SZABAD and F.C. KAFATOS, 1989 Genetic analysis of chorion formation in Drosophila melanogaster. I. The effects of one somatic specific and seven germ-line specific mutations. Developmental Genetics **10**: 87-97.

GARCIA-BELLIDO, A., 1972 Some parameters of mitotic recombination in Drosophila melanogaster. Mol. Gen. Genet. **115**: 54-72.

GARCIA-BELLIDO, A. and J.R. MERRIAM, 1971 Genetic analysis of cell heredity in imaginal discs of Drosophila melanogaster. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68: 2222-2226.

GEHRING, W.J., E. WIESCHAUS and M. HOLLIGER, 1976 The use of "normal" and "transformed" gynandromorphs in mapping the primordial germ cells and the gonadal mesoderm in Drosophila. J. Embryol. Exp. Morphol. 35: 607-616.

HANDKE-KOCIOK, M., and W. LIEBLICH, 1986 A simple method for staining chromosomes in whole embryos of Drosophila. Drosophila Inf. Serv. 63: 142.

HASHIMOTO, C., K.L. HUDSON and K.V. ANDERSON, 1988 The Toll gene of Drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. Cell 52: 269-279.

JANNING, W., 1972 Aldehyde oxydase as a cell marker for internal organs in Drosophila melanogaster. Naturwissenschaften 59: 516-517.

KING, R.C., 1970 Ovarian Development in Drosophila melanogaster, pp. 1-227, Academic Press, New York.

KING, R.C. and J.D. MOHLER, 1975 The genetic analysis of oogenesis in Drosophila melanogaster. In "Handbook of Genetics", Vol. 3. (R.C. King ed.), pp. 757-791, Plenum Press, New York.

KLINGLER, M., M. ERDÉLYI, J. SZABAD and C. NÜSSLEIN-VOLHARD, 1988 The role of torso in determining the terminal anlagen of the Drosophila embryo. Nature 335: 275-277.

KONRAD, K.D., L. ENGSTRÖM, N. PERRIMON and A.P. MAHOWALD, 1985 Genetic analysis of oogenesis and the role of maternal gene expression in early development. In "Developmental Biology", Vol. 1. (L.W. Browder ed.), pp. 577-617, Plenum Publ. Corp., New York.

LEHMANN, R. and C. NÜSSLEIN-VOLHARD, 1986 Abdominal segmentation, pole cell formation, and embryonic polarity require the localized activity of oskar, a maternal gene in Drosophila. Cell 47: 141-152.

LINDSLEY, D.L., and E.H. GRELL, 1968 "Genetic variations of Drosophila melanogaster" Carnegie Inst. Wash. Publ. No. 627.

MAHOWALD, A.P. and M.P. KAMBYSELLIS, 1980 Oogenesis. In "The Genetics and Biology of Drosophila", Vol. 2D (M. Ashburner and T.R.F. Wright, eds.), pp. 141-225, Acad. Press, New York.

MARGARITIS, L.H., 1985 Structure and physiology of eggshell. In "Comprehensive Insect Biochemistry, Physiology and Pharmacology", Vol. 1. (L.I. Gilbert and G.A. Kerkut, eds.), pp. 153-230. Pergamon Press, Oxford.

MARGARITIS, L.H., F.C. KAFATOS, and W.H. PETRI, 1980 The eggsell of Drosophila melanogaster. I. Fine structure of the layers and regions of the wild-type eggshell. J. Cell. Sci. **43**: 1-35.

MÜLLER, J.H., 1932 Further studies on the nature and causes of gene mutations. Proc. 6th Int. Cong. Genetics **1**: 213-272.

PERRIMON, N., 1984 Clonal analysis of dominant female--sterile, germline-dependent mutations in Drosophila melanogaster. Genetics **108**: 927-939.

PERRIMON, N. and M. GANS, 1983 Clonal analysis of the tissue specificity of recessive female-sterile mutations of Drosophila melanogaster using a dominant female sterile mutation Fs(1)K1237. Dev. Biol. **100**: 365-373.

PERRIMON, N., l. ENGSTRÖM and A.P. MAHOWALD, 1986 X-linked female -sterile loci in Drosophila melenogaster Genetics **113**: 695-712.

POULSON, D.F., 1950 Histogenesis, organogenesis and differentiation in the embryos of Drosophila melanogaster Meigen. In "Biology of Drosophila" (M. Demerec, ed.), pp. 168-274. Wiley, New York.

SCHÜPBACH, T., 1987 Germ line and soma cooperate during oogenesis to establish the dorsoventral pattern of egg shell and embryo in Drosophila melanogaster. Cell **49**: 699-707.

SCHÜPBACH, T. and E. WIESCHAUS, 1986 Maternal effect mutations altering anterior-posterior pattern of the Drosophila embryo. Roux's Arch. Dev. Biol. **195**: 302-317.

SONNENBLICK, B.P., 1950 The early embriology of Drosophila melanogaster. In "Biology of Drosophila" (M. Demerec ed.) pp. 62-167, Wiley, London.

SPRENGER, F., L.M. STEVENS and C. NÜSSLEIN-VOLHARD 1989 The Drosophila gene torso encodes a putative receptor tyrosin chinase. Nature **338**: 478-483.

STRECKER, T.R., S.R. HALSHELL, W.W. FISHER and H.D. LIPSHITZ, 1989 Reciprocal effects of hyper- and hypo activity mutations in the Drosophila pattern gene torso. Science **234**: 1062-1066.

SZABAD, J. and C. FAJSZI, 1982 Control of female reproduction in Drosophila: Genetic dissection using gynandromorphs. Genetics **100**: 61-78.

SZABAD, J. and G. HOFFMANN, 1989 Analysis of follicle cell functions in Drosophila: the Fs(3)Apc mutation and the development of chorionic appendages. Dev. Biol. **131**: 1-10.

SZABAD, J., M. ERDÉLYI, G. HOFFMANN, J. SZIDONYA and T.R.F. WRIGHT, 1989 Isolation and characterization of dominant female-sterile mutations of Drosophila melanogaster. II. Mutations on the second chromosome. Genetics **122**: 823-835.

WIESCHAUS, E., 1980 A combined genetic and mosaic approach to the study of oogenesis in Drosophila. In "Development and Neurobiology of Drosophila" (O. Siddiqi, P. Babu, L.M. Hall and J.C. Hall eds.), pp. 85-94, Plenum Press, New York and London.

WIESCHAUS, E. and J. SZABAD, 1979 The development and function of the female germ line in Drosophila: a cell lineage study. Dev. Biol. **68**: 29-46.

WIESCHAUS, E. and C. NÜSSLEIN-VOLHARD, 1986 Looking at embryos. In "Drosophila a Practical Approach", (D.B. Roberts ed.), pp. 199-227, I.R.L. Press, Oxford.

WIESCHAUS, E., J.L. MARSH, and W.J. GEHRING, 1978 Fs(1)K10 A germ-line dependent female sterile mutation causing abnormal chorion morphology in Drosophila melanogaster Roux's Arch. Dev. Biol. **184**: 75-82.

WIESCHAUS, E., C. AUDIT and M. MASSON, 1981 A clonal analysis of the roles of somatic cells and germline during oogenesis in Drosophila. Dev. Biol. **88**: 92-103.

TÁBLÁZATOK

1. táblázat **Petefészek kimérák**

Genotípus		A peték típusa	Kimérák száma[b]
Donor	Gazda		
Apc/rucuca ⟶	+/K1237[a]	Apc	11
K10 w mal ⟶	Apc/rucuca	K10 + Apc	3

a, A K1237 (=Fs(1)K1237) mutáció megakadályozza az olyan petekezdemények fejlõdését, amelyek hordozzák a K1237 mutációt. K1237 nincs hatással a testi sejtek funkciójára.

b, Azokat az eseteket tüntettük fel, ahol a beültetett petefészek feltapadt a gazda nőstények petevezetékére.

2. táblázat **Csíravonal kimérák**

A

A szülők genotípusa		Gazda	A kimérák típusa	
Donor	Gazda	nőstények[a]	Apc/rucuca	rucuca/TM3
rucuca/rucuca x Apc/TM3	+/+ (ORE-R) x K1237/Y	74	14	10

a., A gazda nőstényeket rucuca hímekkel kereszteztük.

B

A szülők genotípusa		Gazda nőstények[b]			
		Apc/rucuca		rucuca/TM3	
Donor	Gazda	Összes	Kiméra	Összes	Kiméra
y v f mal/y v f mal x y v f mal/Y	rucuca/rucuca x Apc/TM3	42	7[c]	37	10

b., A gazda nőstényeket y v f mal/Y hímekkel kereszteztük.

c., Ezek a kimérák tartalmaztak mal/mal, nem festődő petekezdeményeket.

3. táblázat **A röntgensugárzás hatása Apc/rucuca nőstényekre**[a]

Csoportok		N_i számú mozaik nőstényt tartalmazó csoportok[b]					Nőstények			Utód/csoport			Összes utód
Összes N	Utódok származtak	0	1	2	3	4	Vizsg.	Mozaik	%	1	2	≥3	
42	21	21	14,6	5,0	1,2	0,2	413	29[c]	7,0	0	2	19	153

a., 3-5 napos Apc/rucuca nőstényeket sugároztunk be 1500 R dózissal. A nőstényeket 10-es csoportokban vizsgáltuk. A nőstényeket még a besugárzás előtt rucuca hímekkel kereszteztük. Megszámláltuk, hogy a csoportok közül hánytól és hány utód származott.

b., Egy Poisson eloszlás alapján becsült érték; $N_i=P(i)N$, ahol $P(i)=e^{-v}v^i/i!$, és figyelembe véve, hogy $P(0)=N_0/N=e^{-v}$

c., $29=(14,6x1)+(5x2)+(1,2x3)+(0,2x4)$

4. táblázat **A "kivételes" peték képződésének jellemzői**

Életkor a besugárzás idején[a]	Nőstények[b] Vizsgált	Mozaik	%	Minimális vizsgálati idő[c] (nap)	"Kivételes" peték száma nőstényenként 1	2	≥3	Összes "kivételes" pete	Átlagos klón-méret[d]	Klónok száma nőstényenként[e] 0	1	2	≥3	Összes klón
Kontroll	374	4	1,1	-?	1	2	2	10	3,5± 0,7	370	4	0	0	4
3	244	16	6,6	8	11	1	4	71	13,5±13,2	228	15,4	0,5	0	16
72	201	41	20,4	12	16	3	22	460	10,8±10,5	160	36,5	4,2	0,3	46
120	109	24	22,0	12	12	0	12	139	10,6± 6,7	85	21,1	2,6	0,2	27
360	385	119	30,9	17	76	25	18	223	5,4± 3,4	226	98,4	18,2	2,4	143

a., Órák a pete lerakása után. (3= blasztoderma; 72= korai harmadik stádiumú lárva; 120= fiatal báb; 360= kifejlett adult.)

b., A vizsgálathoz 1000 R dózissal az egyedfejlődés különböző stádiumaiban besugárzott Apc/rucuca nőstényeket használtunk fel

c., A mozaikok 95%-ának azonosításához szükséges idő.

d., Az adatok a ≥3 petét tartalmazó klónokra vonatkoznak.

e., Egy Poisson eloszlás alapján becsült értékek; $N_i=P(i)N$, ahol $P(i)=e^{-v}v^i/i!$, figyelembe véve, hogy $P(0)=N_0/N=e^{-v}$ (hasonlóan az 1. táblázathoz)

5. táblázat **A felnőtt korban besugárzott nőstények "különleges" petéinek megjelenési gyakorisága és típusai**[a]

A peték típusai		Egy petéből álló klónok		≥3 petéből álló klónok	
		db	%	db	%
"Heterogén" peték	Nem kelt ki	20	16.0	15	15.3
	Kikelt	2	1.6	4	4.1
Vadtípusúhoz hasonló peték	Nem kelt ki	78	62.4	51	52.0
	Kikelt	25	20.0	28	28.6
Összesen		125	100.0	98	100.0

a., Azokat a nőstényeket, amelyektől egyenként egy "kivételes" pete származott, képviseli az "Egy petéből álló klónok" csoportja. Azokat amelyektől ≥3 "kivételes" pete származott a "Follikuláris őssejt eredetű klónok" jelentik, amelyek valószínűleg a prefollikuláris sejtekben indukálódott Apc^{+} klónokat reprezentálják.

6. táblázat **Az Apc$^+$ mozaikosság jellemzői**[a]

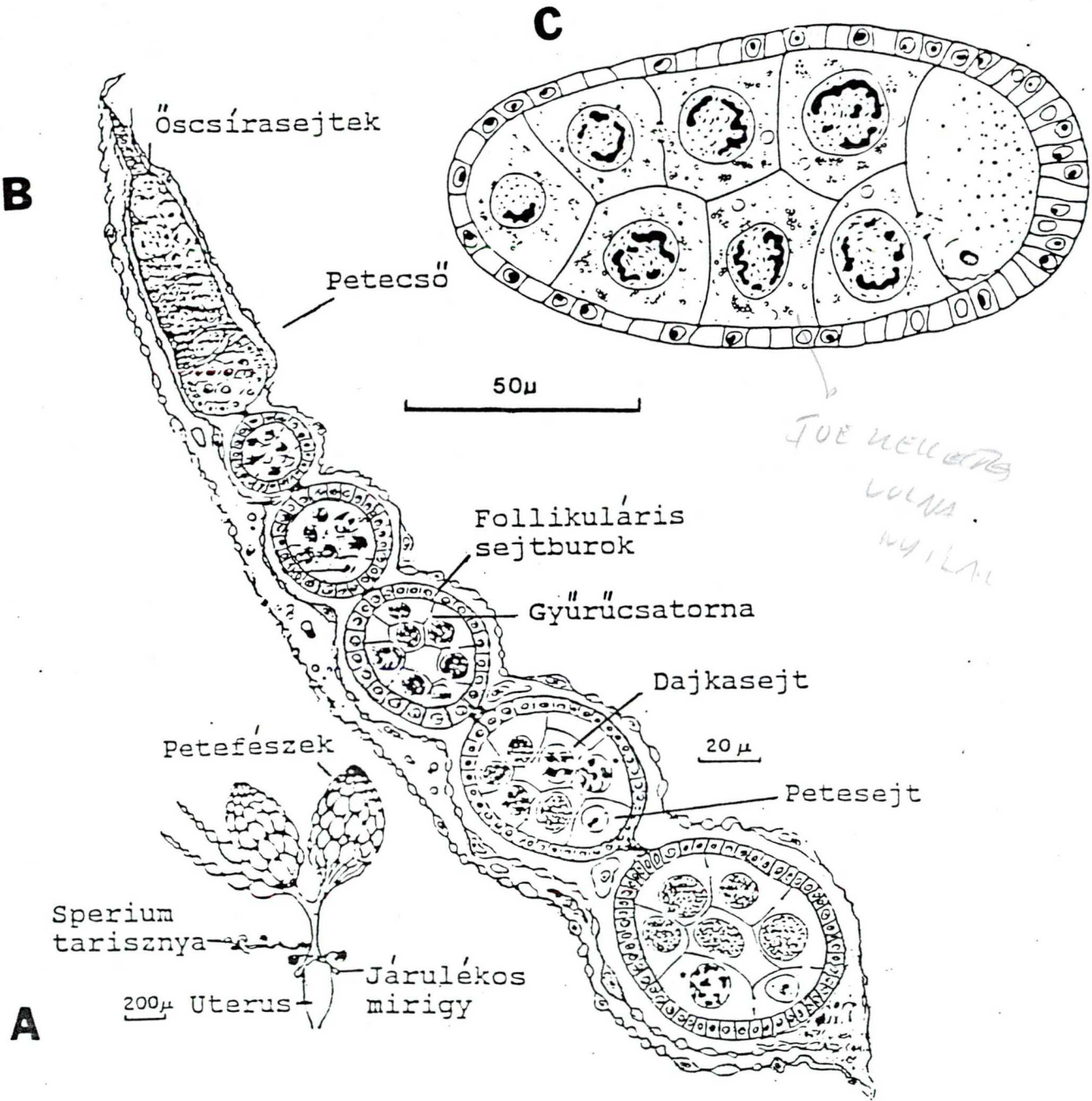
Sajátság	Besugárzás ideje	
	Felnőtt	Lárva
A mozaikosság gyakorisága ("kivételes" peték)	30.9 %	20.4 %
A besugárzott nőstények hány százalékától származott utód	7.0 %[b]	n.v.
Apc/Apc$^+$ allélek aránya az utódokban	1:1	1:1
Egyetlen "kivételes" pete/Apc$^+$ klón	87.0 %	46.0 %
Több "kivételes" pete/Apc$^+$ klón	13.0 %	54.0 %
Vad típushoz hasonló "kivételes" peték	82.4 %	92.6 %
"Heterogén" peték	17.6 %	7.4 %
Vad típushoz hasonló "kivételes" peték, amelyekből lárvák keltek ki	29.1 %	87.0 %
"Heterogén" peték, amelyekből lárva kelt ki	10.0 %	29.4 %
Az első "kivételes" pete megjelenésének átlagos ideje (nap)	10.7	5.7
A mozaikok 95%-ának azonosításához szükséges idő (napok)	17.0	12.0
A "heterogén" peték 95%-ának azonosításához szükséges idő (napok)	14.0	19.0
Vad típushoz hasonló "kivételes" peték azonosításához szükséges idő (napok)	21.0	20.0

a., 1000 R-t használtunk az Apc$^+$ mozaikosság indukálásához, kivéve a b., esetet.

b., 1500 R-t használtunk.

n.v.= nem vizsgáltuk

ÅBRÅK



1.ábra Az oogenezis sematikus ábrázolása Drosophila melanogasterben.

A., a nőstény Drosophila belső szaporító szervei

B., egy petecső (ovariola) rajza, benne különböző stádiumú petekezdeményekkel

C., egy petekezdemény nagyított rajza

(King, 1970 nyomán).

2.ábra A peteérés utolsó mozzanatainak ábrázolása

A., A follikuláris sejtek megkezdik benyomulásukat a pete- és dajkasejtek közé. A follikuláris sejtek fokozatosan beborítják a petesejt elülső részét és megkezdik a vitellinmembrán és a korion szintézisét. A határsejtek elérték a petesejt- dajkasejtek határvonalat és megindul a mikropílus szintézise.

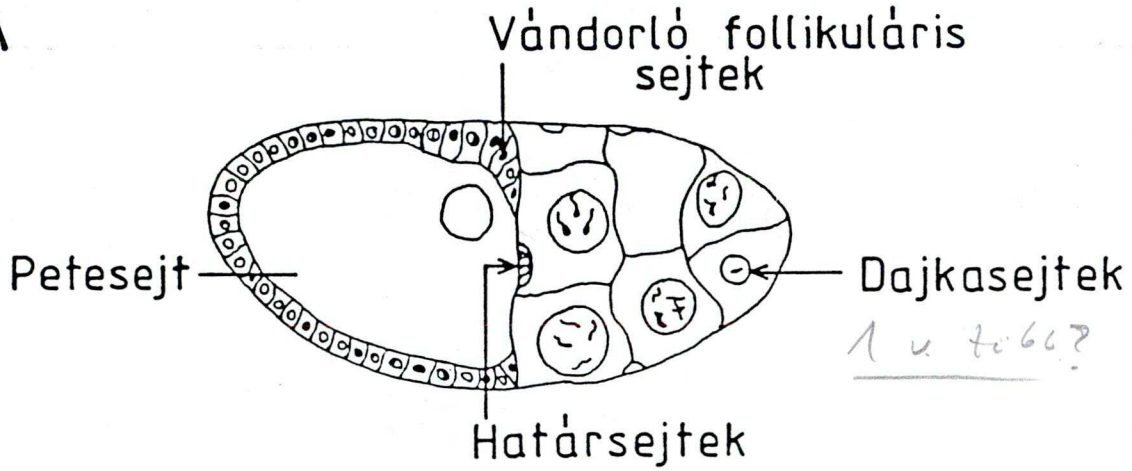
B., A dajkasejtek már csak "sapkát" alkotnak a petekezdemény elülső végén. A háti függelékeket a degenerálódó dajkasejtek mellett előrenyomuló follikuláris sejtek alakítják ki.

C., Egy kifejlett pete részei

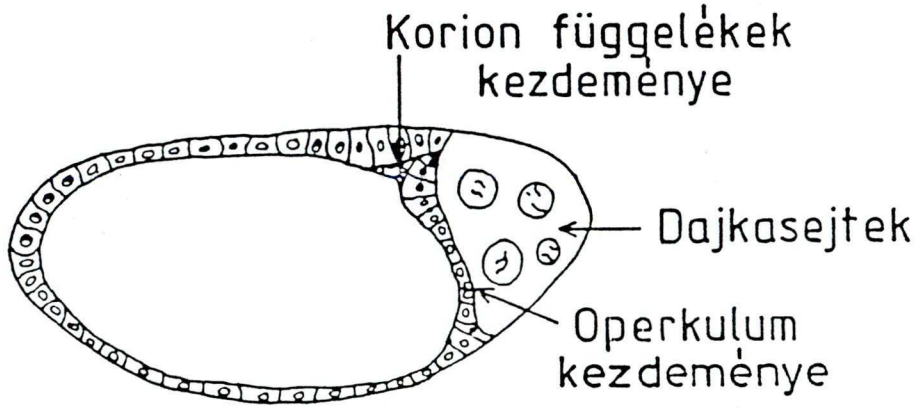
A kifejlett petét burkoló korionnak jellegzetes sokszögletű mintázata van.

(A muslica egy kifejlett petéje 0,5 mm hosszú.)

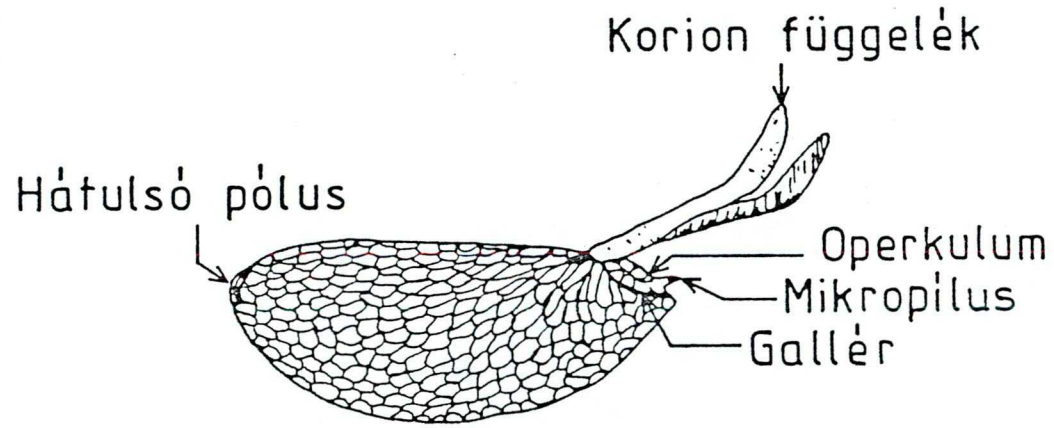
A

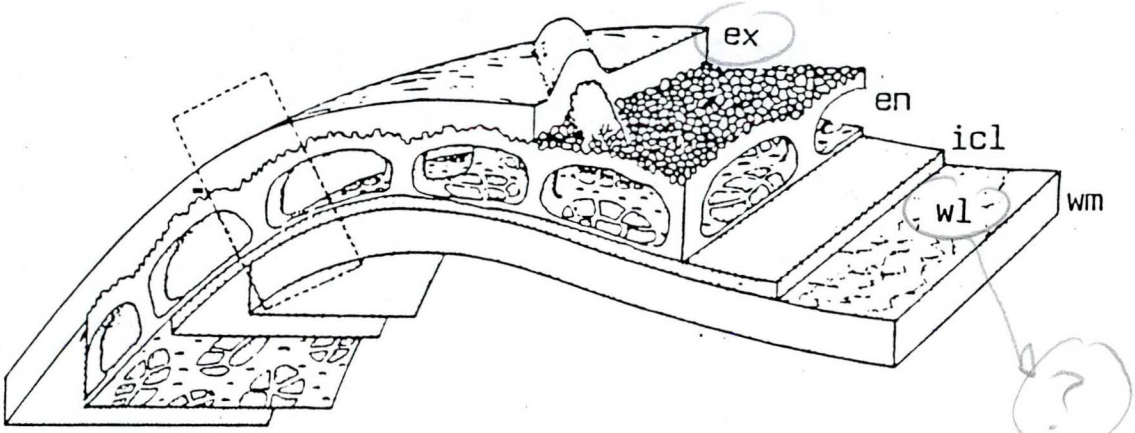

Vándorló follikuláris sejtek
Petesejt
Dajkasejtek
Határsejtek

B


Korion függelékek kezdeménye
Dajkasejtek
Operkulum kezdeménye

C


Korion függelék
Hátulsó pólus
Operkulum
Mikropilus
Gallér



3.ábra A Drosophila melanogaster pete védőburkainak héjszerű szerkezete

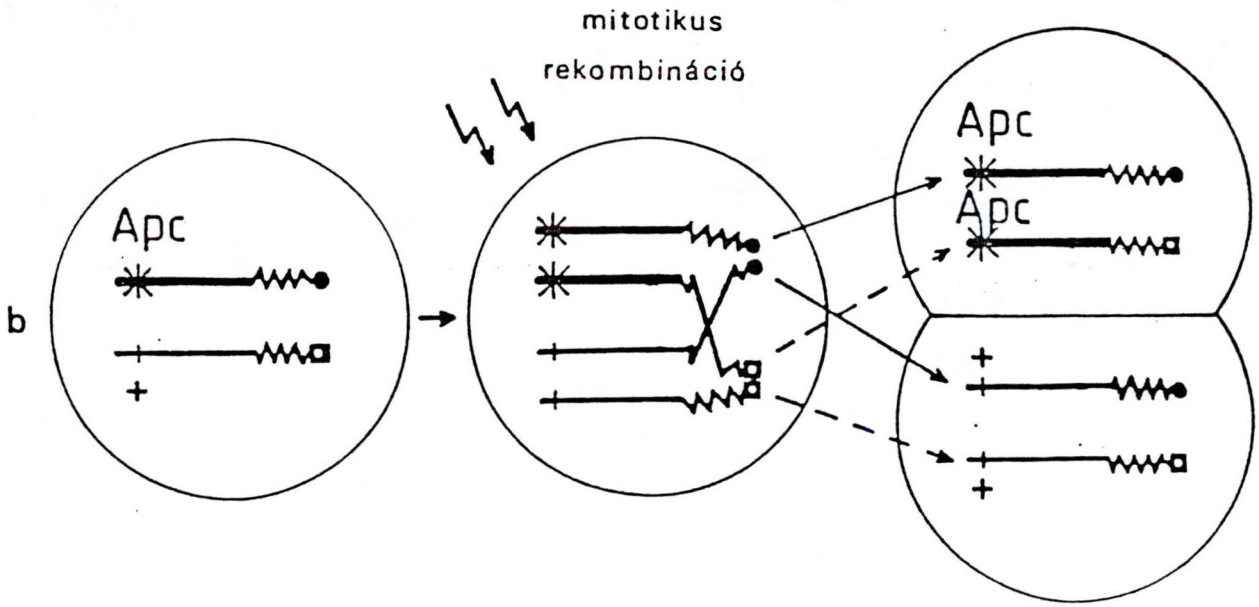
vm - vitellinmembrán

en - endokorion

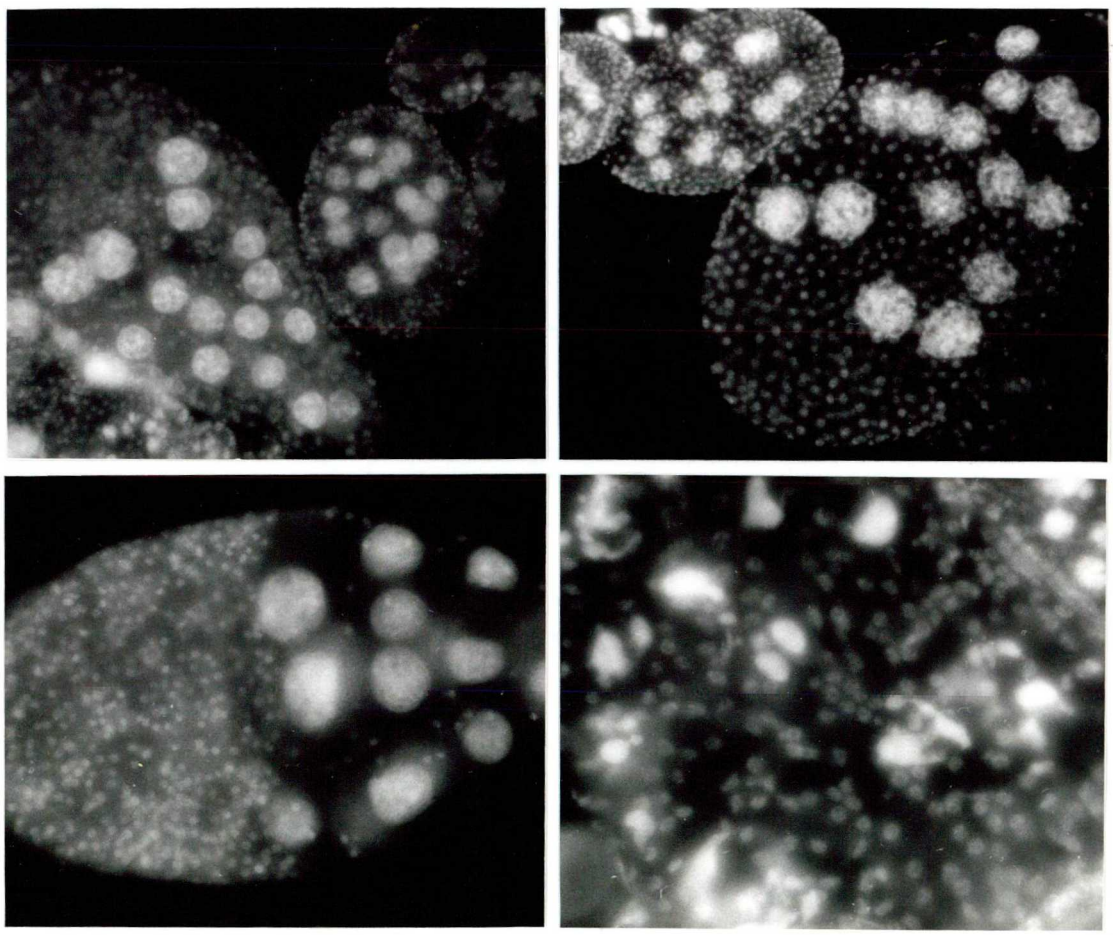
icl- legbelső korionréteg (innermost chorionic layer)

wm - viaszréteg

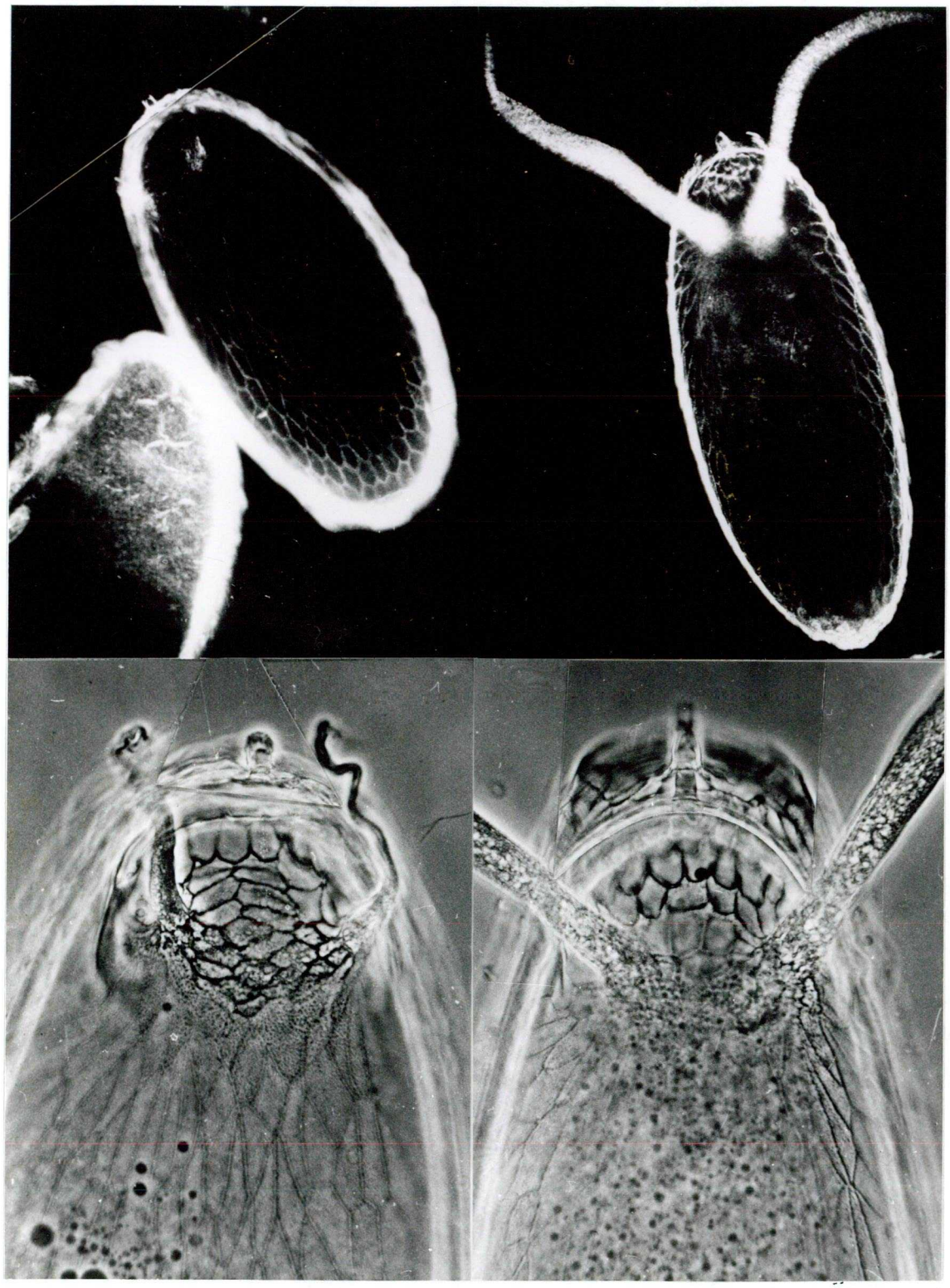
A szaggatott vonalakból álló téglalap átmettszetet jelöl.



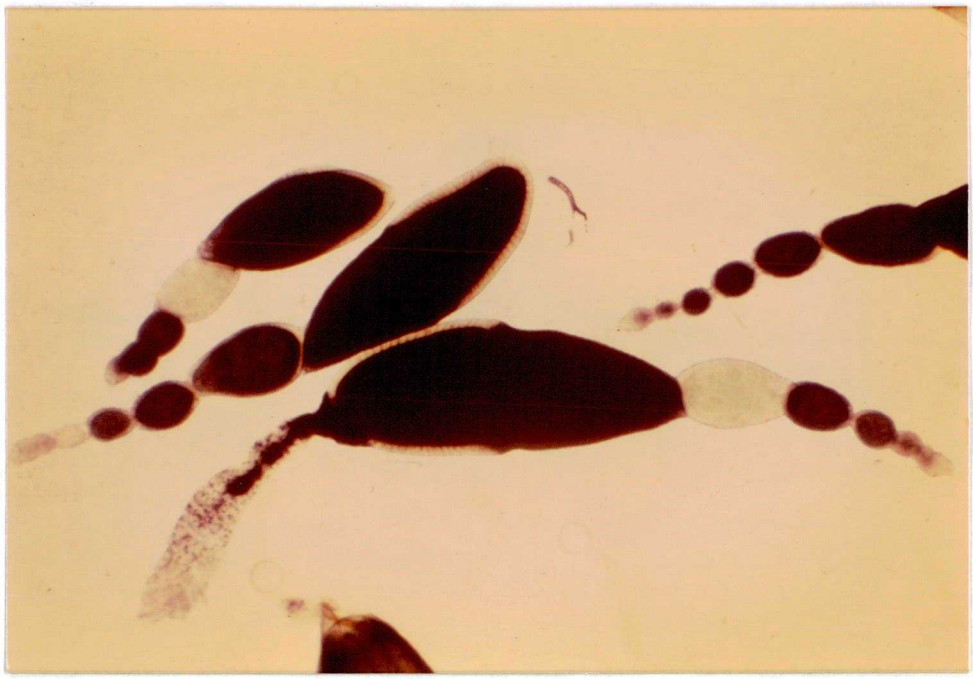
4.ábra Az Apc mutációt nem tartalmazó Apc^{+} sejtek kialakulása mitotikus rekombináció után. Az utódsejtek egyike nem tartalmazza az Apc allélt, így tovább fejlődhet. A vékonyabb ill. vastagabb vonalak az apai ill. anyai kromoszómákat jelképezik. A + jel a vadtípusú allélt szimbolizálja.



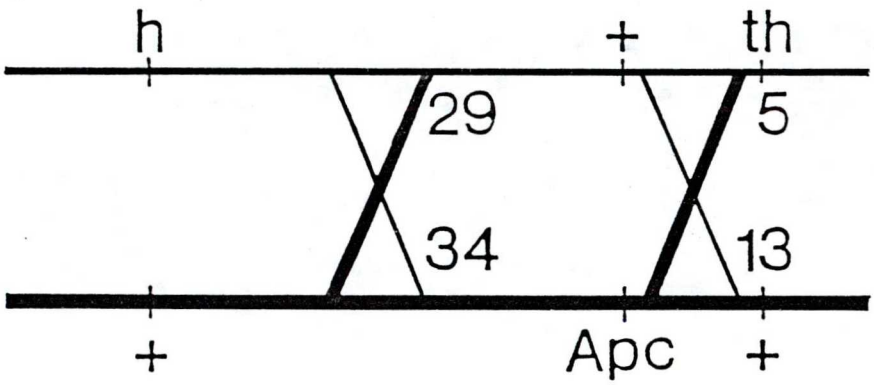
5.ábra Vadtípusú (bal oldalt) és az Apc mutációt hordozó petekezdemények. A felvételek DAPI festés után fluoreszcens mikroszkópban készültek. Jól láthatók a 15 dajkasejt nagy és a follikuláris sejtek kis sejtmagjai. Míg a vadtípusú dajkasejtek magjai épek, az Apc mutációt hordozókék piknotikusak, szétesőek, különösen a fejlettebb petekezdeményekben (nagyítás 280x, kivéve a jobb oldali alsó felvételt, ahol 560x).



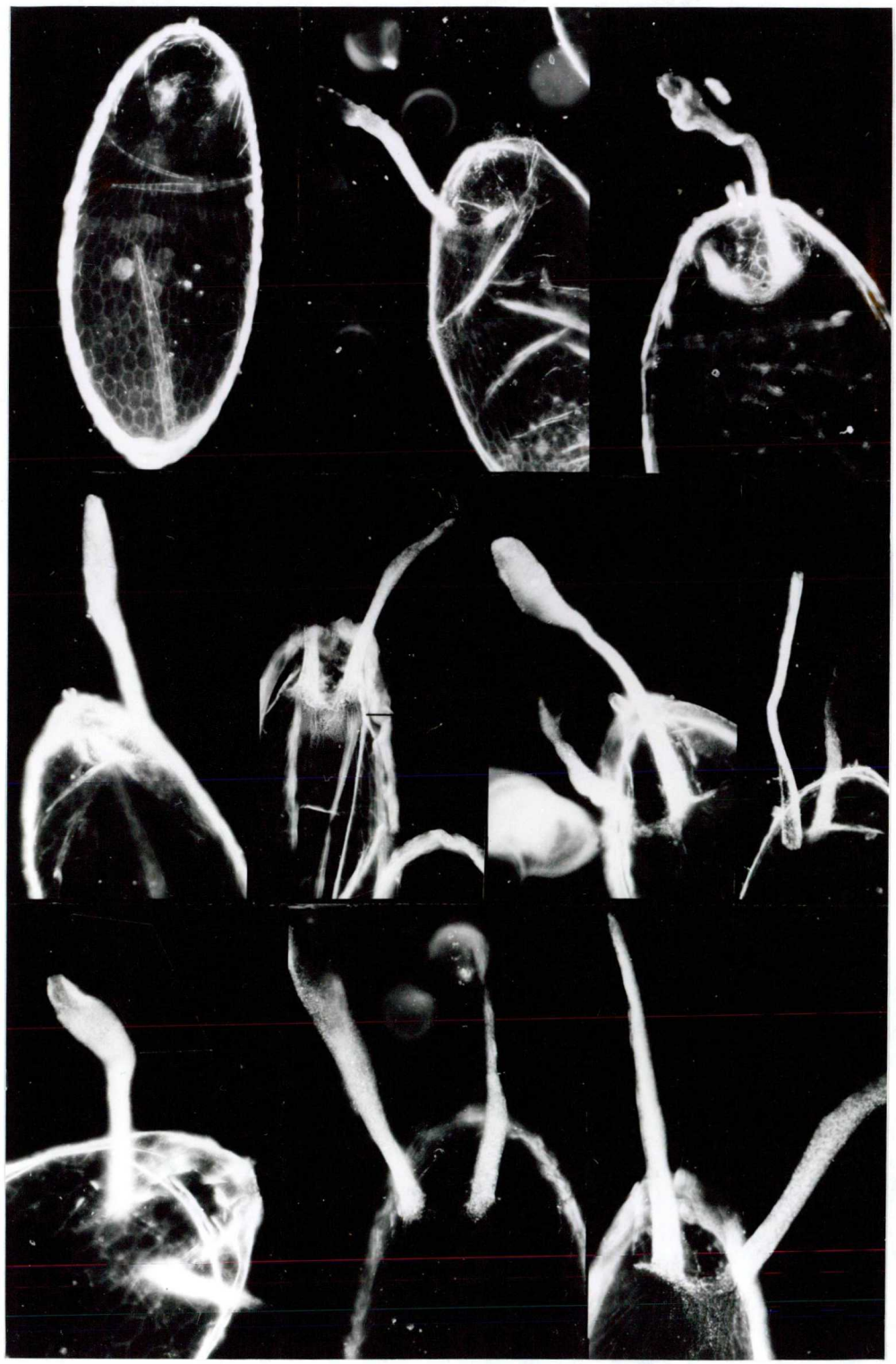
6.ábra Apc- (balra) és vadtípusú (jobbra) peték sötétlátóterű (felső) és fáziskontraszt (alsó) képe. Az Apc peték korion-függelékei, melyek a peték hátoldalán elöl képződnek, fejletlenek.



7.ábra Az Apc/rucuca, y v f mal ősivarsejteket is hordozó kiméra nőstények néhány petecsöve. A mal homozigóta ősivarsejtekből származó petekezdemények nem festődnek. (Megjegyzés: a mezodermális eredetű sejtekben nincs aldehid-oxidáz enzimaktivitás, ezért nem festődnek a follikuláris sejtek.)



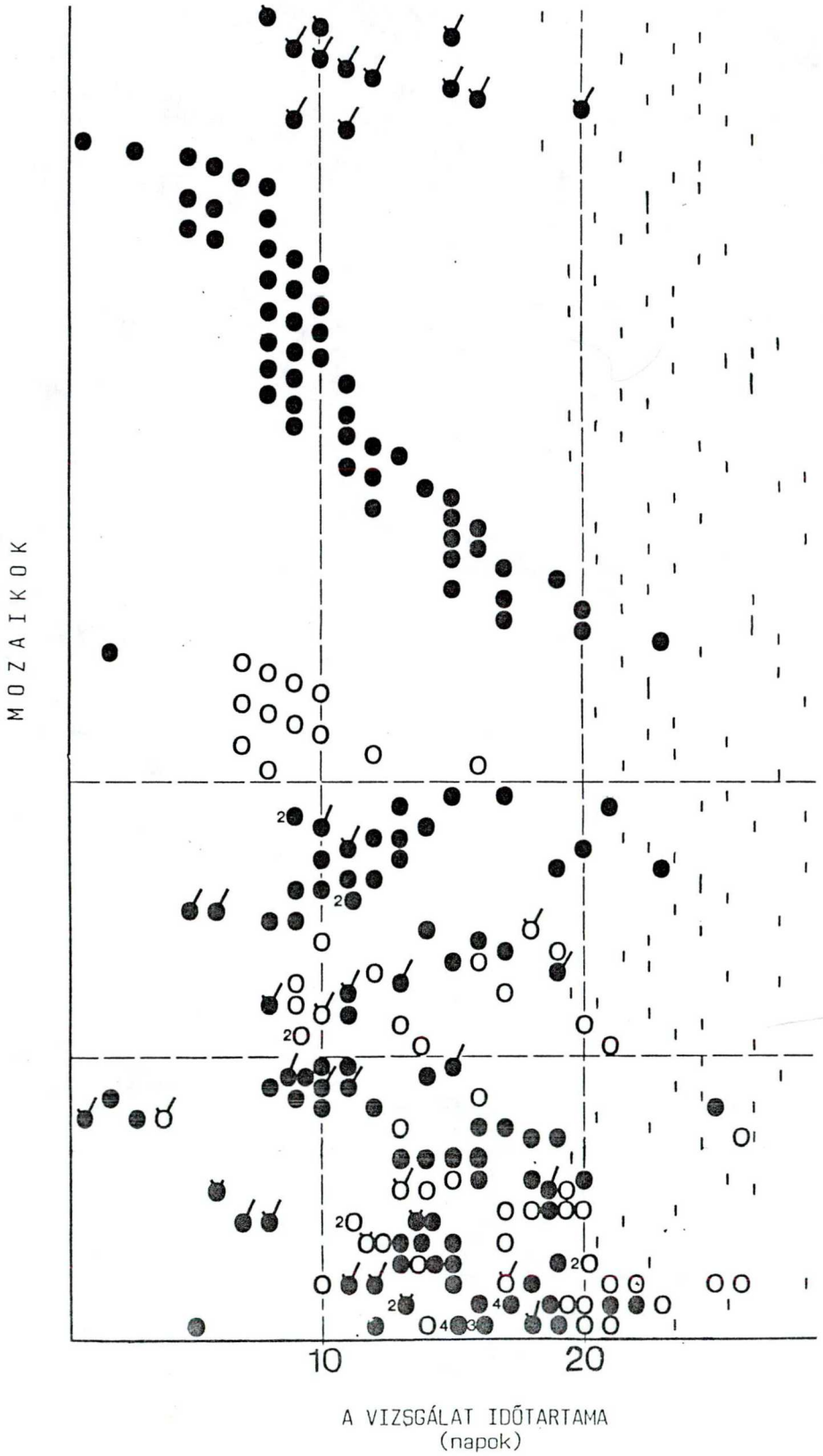
8.ábra A számok az Apc/rucuca ősivarsejteket és +/K1237 testi sejteket hordozó kiméráktól származó különféle genotípusú rekombináns nőstény utódait jelölik. Az utódok genotípusára a rucuca/rucuca hímekkel végzett keresztezés alapján következtettünk.

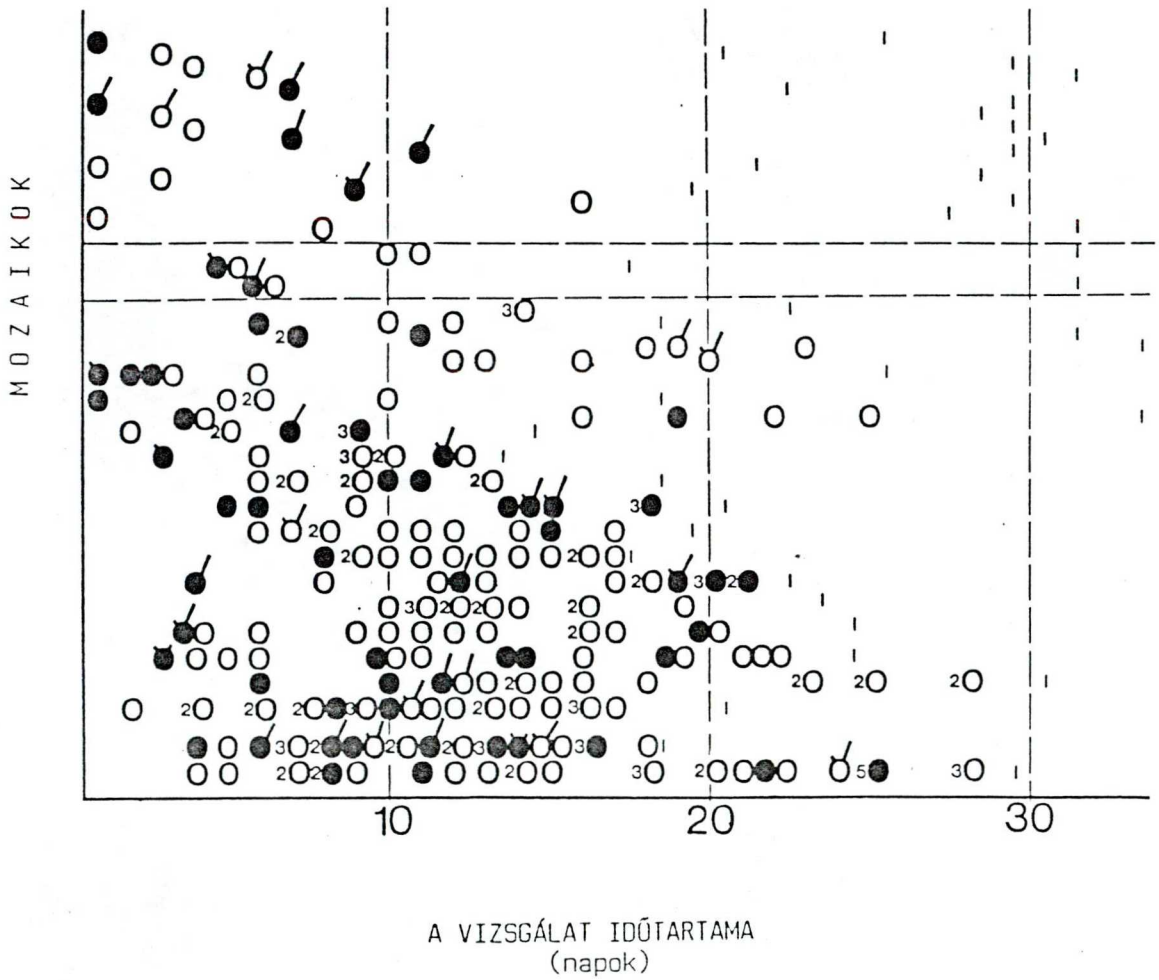


9.ábra A "kivételes" peték Apc^{+} klónokat jeleznek. Hátoldali függelékeik alakban és méretben is nagy mértékben különbözhetnek.

10.ábra A kifejlett nőstények besugárzását követően megjelenő "kivételes" peték időbeli ábrázolása.

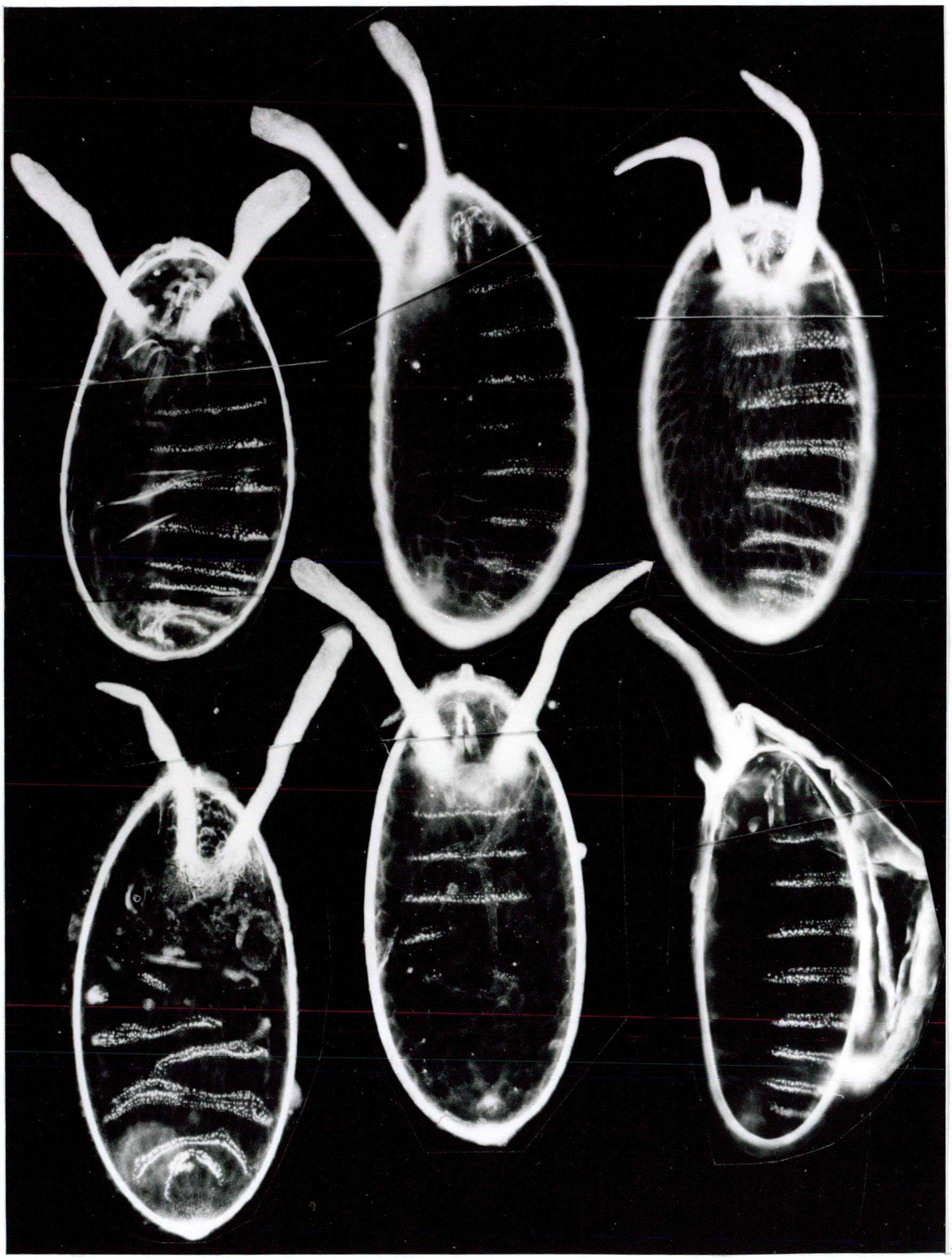
Az üres körök jelképezik azokat a petéket, melyekből lárvák keltek ki. A kitöltöttek azokat, amelyekből nem keltek ki lárvák. A hátoldali függelékeket csak a különleges esetekben jeleztük. A vízszintes szaggatott vonalak az 1, 2, ≥3 "kivételes" petét rakó osztályok határait jelzik. Az egyvonalban levő jelek egy mozaik nőstény petéit reprezentálják. (Ha a nőstény egy napon több petét rakott, kis számmal jeleztük.) A sorvégi rövid vonalak a megfigyelés időtartamát jelölik.


MOZAIKOK
10
20
A VIZSGÁLAT IDŐTARTAMA
(napok)



11.ábra A különféle típusú "kivételes" peték megjelenésének időbeli lefutása lárvák besugárzása esetén. A jelölések megegyeznek a 10. ábrán láthatókkal.

12.ábra Sötét látóterű felvételek mozaik petékben fejlődött és elpusztult embriókról. A hasoldalt és a szegmenteket kitin horogsorok jelzik. A petékben lárvák fejlődtek, de nem tudtak kikelni. A felső sor közepén lévő lárva közel azonos a vadtípusúval. Az első sor jobb oldalán lévő lárvának hiányoznak a feji struktúrái, és szegmentjei is fejletlenek. A jobb alsó petének csak egy hátoldali függeléke volt. A benne kifejlődött lárvának hiányzik néhány feji struktúrája, éppen azon az oldalon, ahol nem fejlődött ki hátoldali függelék.



13.ábra A "kivételes" peték megoszlása annak függvényében, hogy az egyedfejlődés mely szakaszában indukáltuk az Apc^{+} klónokat.

3 óra - blasztoderma

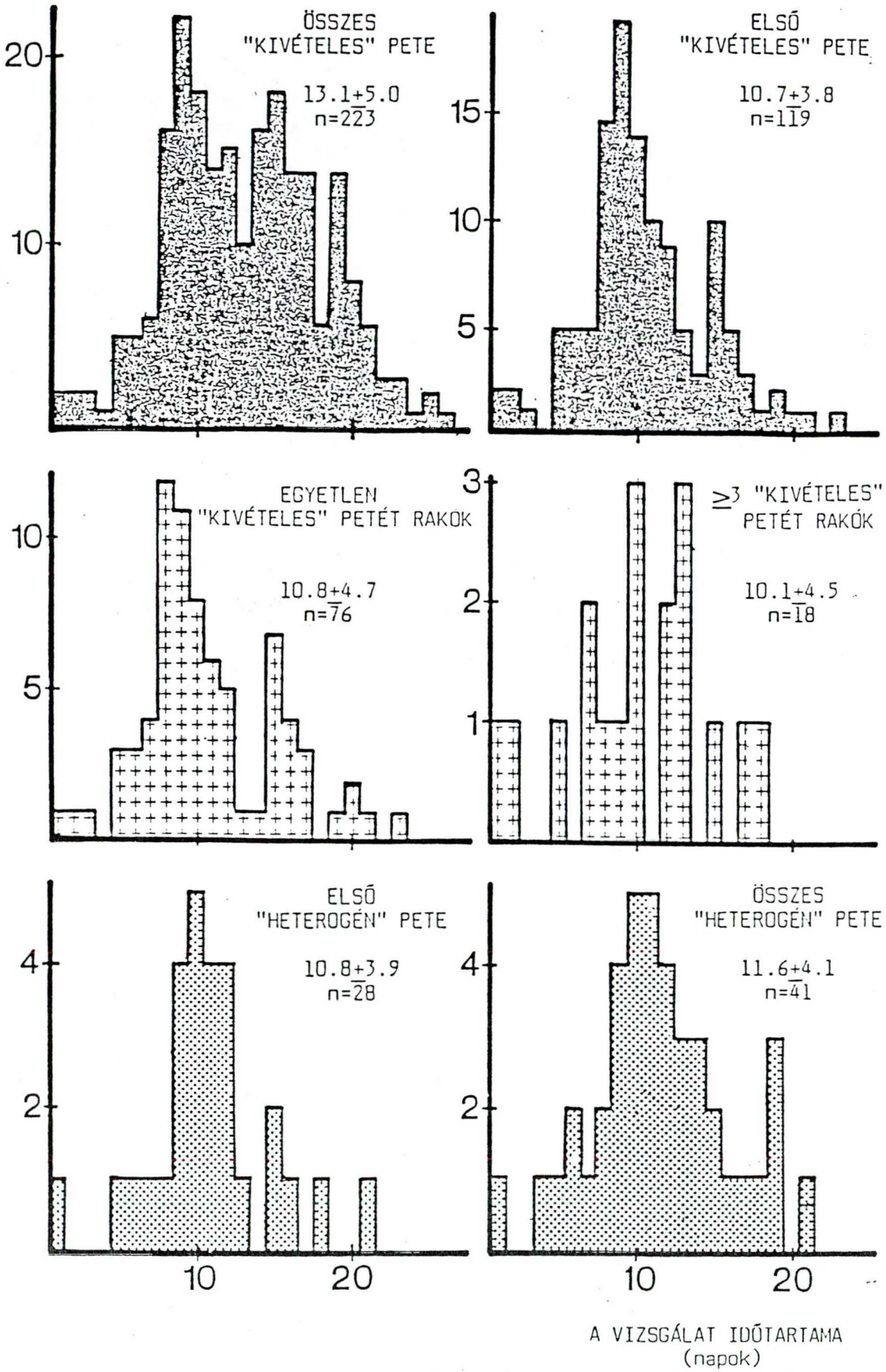
72 óra - fiatal harmadik stádiumú lárva

120 óra - fiatal báb

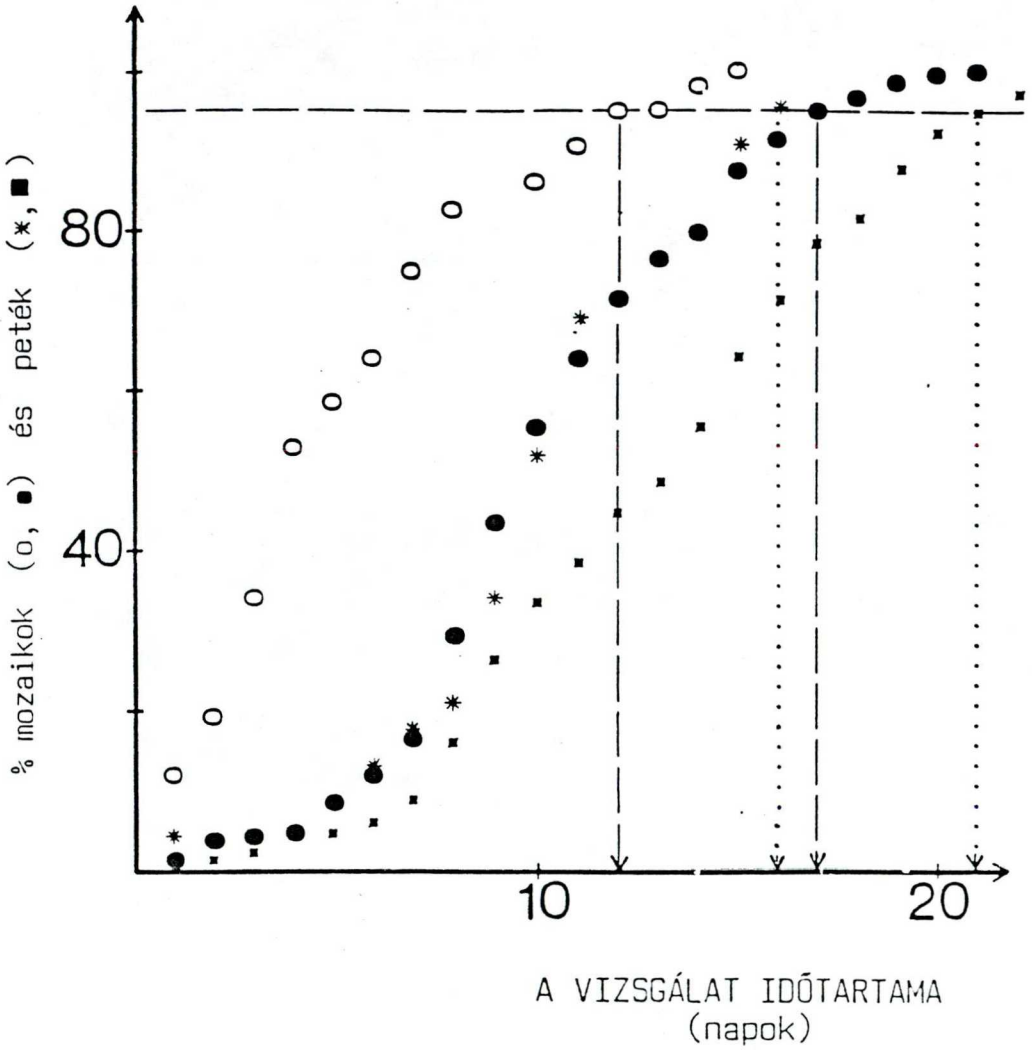
360 óra - 5 napos adult

A feketével jelzett petékből nem keltek ki lárvák, míg a fehérrel jelzettekből igen.

Kontroll
3
72
120
360
60
20
% "Kivételes" peték
Osztályok



14.ábra Az oszlopdiagrammok azt ábrázolják, mikor rakták le a különféle típusú "kivételes" petéiket a felnőttként besugárzott nőstények.



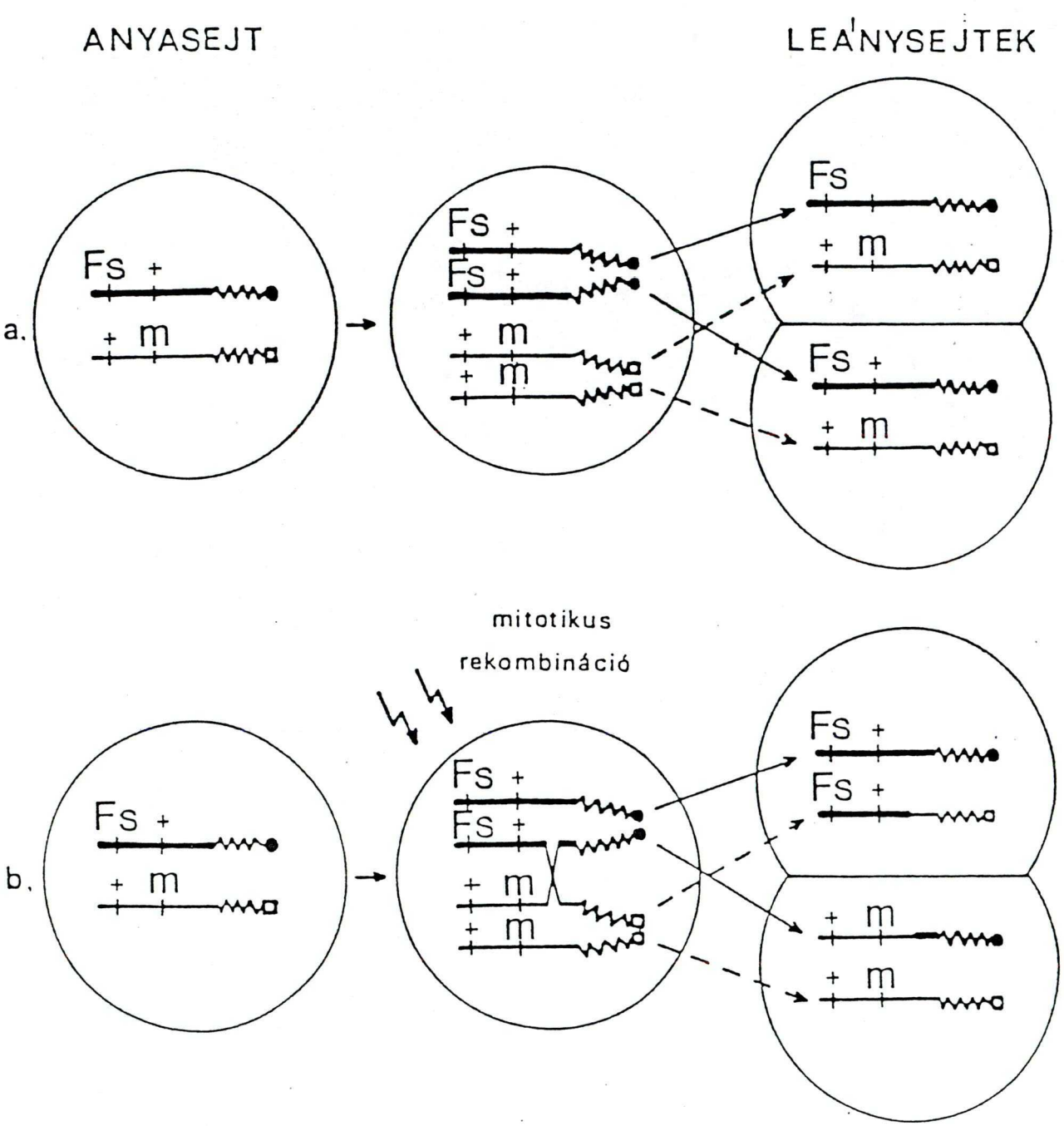
15.ábra A "kivételes" peték megjelenésének időbeli lefutása

O - lárvális (72 óra) besugárzás után

● - adult (360 óra) besugárzás után

✱ - heterogén (egy, másfél vagy két rövid hátoldali függelékű)peték megjelenése adultok besugárázása után

■ - az ép peték megjelenése adult besugárzás nyomán



16.ábra Domináns nőstény-steril technika sematikus ábrázolása.

Mitotikus rekombináció után egy, a vizsgált mutációra homozigóta leánysejt képződik, amely folytathatja fejlődését, amennyiben a m mutáció azt nem akadályozza. A nőstény összes többi sejtje az Fs mutáció miatt fejlődésképtelen.