

BALANSZER KROMOSZÓMA IZOLÁLÁSA ÉS FELHASZNÁLÁSA
FEJLŐDÉSGENETIKAI VIZSGÁLATOKHOZ CAENORHABDITIS
ELEGANS ÖNTERMÉKENYITŐ RENDSZERBEN

Doktori értekezés

Írta:

Deák Péter

MTA Szegedi Biológiai Központ

Genetikai Intézet

Rovargenetikai Csoport

Szeged, 1981

Elsősorban köszönettel tartozom témavezetőmnek,
Dr. Fodor Andrásnak, elméleti és módszertani ismereteim
megalapozásáért.

Köszönetet mondok Dr. Alföldi Lajos professzornak,
az SZBK és a Genetikai Intézet igazgatójának, hogy bizto-
sitotta a kutatáshoz szükséges munkafeltételeket.

Köszönetet mondok a Rovargenetikai Csoport munkatár-
sainak és vezetőjének, Dr. Kiss Istvánnak, akikkel eredmé-
nyeimet állandóan megbeszélhettem, s ezek a megbeszélések
rendkívül hasznos hozzájárulást jelentettek az eredménye-
im értékeléséhez.

Köszönöm Dr. Orosz Lászlónak, hogy genetikai szemléle-
tet adott.

Köszönet illeti Kulcsár Erika aszisztenst, lelkiisme-
retes munkájáért, továbbá Dusha Bélát, az ilusztrációk
szakszerű elkészítéséért.

TARTALOMJEGYZÉK

	Oldal
BEVEZETÉS.....	1.
IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	3.
1. A <i>C. elegans</i> önmegtermékenyítő fonalféreg	
jellemzése.....	3.
1.1. A <i>C. elegans</i> morfológiája.....	3.
1.2. A <i>C. elegans</i> egyedfejlődése.....	5.
1.3. A <i>C. elegans</i> szaporodása.....	8.
1.4. A <i>C. elegans</i> , mint genetikai objektum.....	9.
2. Az egyedfejlődésben szerepet játszó gének	
jellemzése.....	10.
2.1. Kondicionált letális mutációk.....	10.
2.2. Recesszív letális mutációk.....	12.
2.3. A balanszer kromoszóma.....	13.
ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	16.
1. Anyagok.....	16.
2. Nematoda törzsek.....	16.
3. Törzsek fenntartása, keresztezések,	
rekombinációs értékek számolása.....	18.
4. Balanszer kromoszóma izolálása Röntgen-	
sugárzással.....	19.
5. EMS-el indukált letális mutációk izolálása..	21.
6. Kromoszóma festés.....	22.
EREDMÉNYEK.....	23.
1. Crossing-over szupresszor azonosítása	
az X kromoszómán.....	23.

2. A Bal-X-1 kromoszóma alkalmas recesszív letális mutációk kiegyensúlyozására.....	33.
EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA.....	34.
1. Az SZT1 jellemzési adatainak értelmezése.....	34.
2. A Bal-X-1 interkromoszómális hatása.....	35.
3. Elképzelések a C. elegans kromoszómák centromerjeinek elhelyezkedésére.....	37.
4. Recesszív letálisok fenntartása.....	38.
IRODALOMJEGYZÉK.....	40.

BEVEZETÉS

A magasabbrendű élőlények egyedfejlődése a sejtek megsokszorozódásából és differenciálódásából, a szövetek és szervek morfogeneziséből áll. E biológiai folyamatok genetikailag meghatározottak; az ún. "differenciális génaktivitás" eredményei. Másképpen úgy is mondhatjuk, hogy az egyedfejlődés egy genetikai program megvalósulásának folyamata. E program logikájáról azonban még nagyon kevés információnk van.

Az egyedfejlődés tanulmányozására - mint általában a biológia lényegi összefüggéseinek megértéséhez - a megfelelő módszer a genetikai analízis. Ennek lényege, hogy a programban résztvevő gének közül minél többet mutációk révén azonosítunk, szerepüket, szabályozásviszonyaikat tisztázzuk. Munkánk sikere érdekében azonban csakis véges számú események tanulmányozására vállalkozhatunk. Ezért az egyedfejlődés egy adott problémája megértésének egyik legfontosabb feltétele a megfelelő modell kiválasztása. Fejlődésgenetikai vizsgálatokra jelenleg egyik legalkalmasabb kísérleti objektum - főleg SYDNEY BRENNER munkájának köszönhetően - a Caenorhabditis elegans (továbbiakban C. elegans) öntermékenyítő fonalféreg. E fajt igazi eukarióta volta mellett a relative egyszerű sejtes felépítés és a genetikai analízisre való alkalmasság jellemzi.

Másik fontos, metodikai probléma a fejlődésben fontos gének mutációkkal való azonosítása, és a mutánsok fenn-tartása. Mivel az ilyen génfunkciók nélkülözhetetlenek az

állat számára, mutációjuk rendszerint az egyed pusztulását eredményezi, tehát az ilyen mutációknak nincs látható fenotípusa. Ezek "láthatóvá tételéhez" szükségesek fenotípusosan jól elkülöníthető, a vizsgált génekkel kapcsolt, un. marker mutációk, melyek a fejlődés szempontjából különbözőek. Biztosítani kell továbbá, hogy a letális mutációk jelölése a vizsgálat során végig megmaradjon, vagyis a letális mutációk heterozigóta formában fenntarthatók legyenek a rekombináció veszélye nélkül. Ezt rekombináció gátló, balanszer kromoszómák létrehozásával lehet elérni.

Erőfeszítéseink a *C. elegans* genetikai rendszerének ilyen irányu kibővítésére irányulnak. Célul tűztük ki egy, az ivari (X) kromoszóma nagy részét rekombináció gátlás révén kiegyensúlyozó balanszer kromoszóma előállítását és jellemzését, valamint az X kromoszóma e régiójában lokalizálható recesszív letális mutációk izolálását és részleges jellemzését.

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

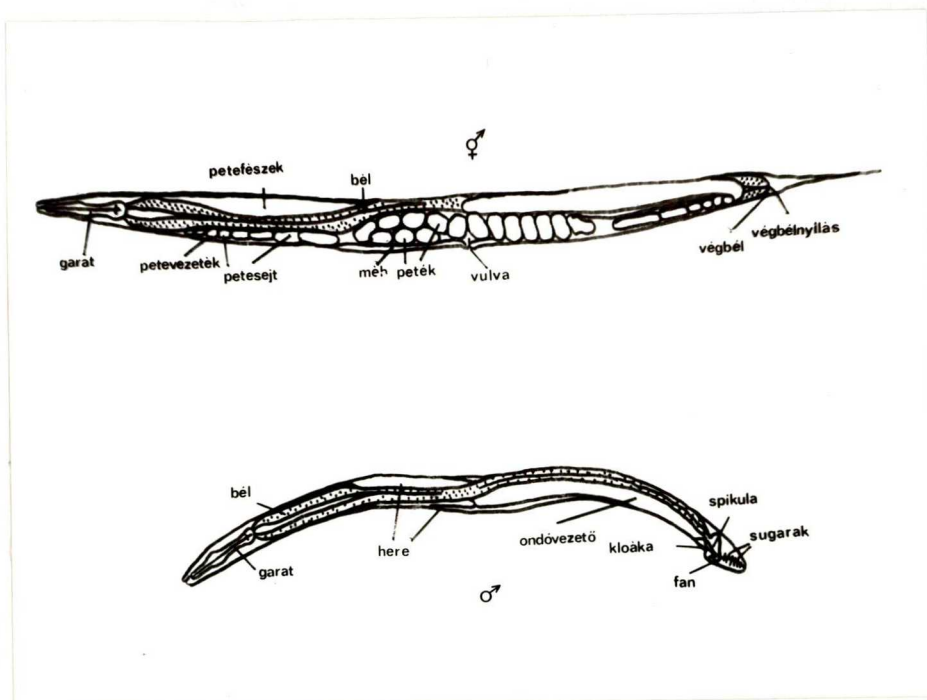
1. A C. elegans öntermékenyítő fonalféreg jellemzése

A C. elegans egy szabadon élő, talajlakó, öntermékenyítő fonalféreg faj. Standard, szabályozható laboratóriumi körülmények között könnyen, és olcsón tartható. Előnyös tulajdonsága, hogy sejtjei, belső szervei élő állatban közönséges fénymikroszkóppal tanulmányozhatóak. ELLSWOOTH DOUGHERTY (1959, 1963) javasolta először genetikai vizsgálatok objektumaként. Ivaros szaporodását, citológiáját és a gametogenezisét először HONDA (1925) illetve NIGON (1949, 1955, 1965) tanulmányozták.

SYDNEY BRENNER (1973, 1974) dolgozta ki a faj formális genetikáját, uttörő munkája eredményeként bebizonyosodott, hogy a C. elegans megfelelő modellje az egyedfejlődésre, differenciálódásra és viselkedésre képes eukarióta állati szervezeteknek, s jelenleg egyik igen fontos kísérleti objektum az állati egyedfejlődés és viselkedés genetikai alapjainak tanulmányozásában.

1.1. C. elegans morfológiája

Egy felnőtt egyed kb. 1 mm hosszú és 70/um átmérőjű, és mindössze 810 szomatikus sejtből áll (Sulston, 1977). Egyszerű, a Rhabditidákra jellemző felépítésű (Chitwood, 1950). Hengeres testét egy külső hipodermális sejttel belső izomsejt sorokkal együtt alkotja. Szájnyílása a garatba torkollik (1. ábra). A garat szabályozza a táplálék



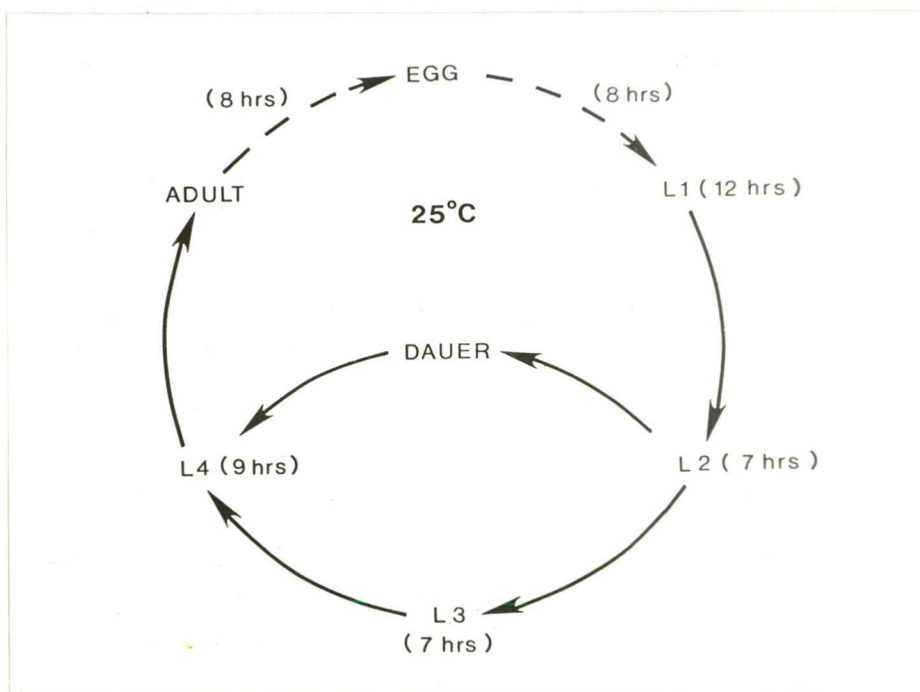
1. ábra *C. elegans* himnős (felül) és him (alul) egyed
sematikus képe.

áramlását a bélben. Az idegrendszer sejtjeinek nagyobb része az idegrostnyalábok által a garat körül alkotott idegyűrűben vagy agyban helyezkedik el. Az idegsejtek - érzők és mozgatók egyaránt - ganglionokba csoportosulnak. A hasi idegköteg olyan mozgató neuronokból áll, melyek a testizomzatot idegzik be (White, 1976). Kezdetleges, néhány sejt-ből álló kiválasztó és érzékszerveik vannak. Az öntermékenyítő himnősek (hermafroditák) szaporító szerve két visszahajló karból áll. Mindkettő egy-egy petefészekből petevezeték-ből, himivarsejt tárolóból és méhből áll. A gonádkarok közös vulvában végződnek, ezen keresztül rakja le az állat a petéit. A természetes populációkban igen ritkán

előforduló hímeknek egy heréjük és párzószerük van, ondóvezetőjük a végbélhez kapcsolódva kloakát alkot (1. ábra).

1.2. A C. elegans egyedfejlődése

A C. elegans növekedését és szaporodását különböző hőmérsékleteken BYERLY és mtsi (1975, 1976a, 1976b) részletesen tanulmányozták (2. ábra)



2. ábra A C. elegans életciklusa. A zárójelben lévő számok az egyes lárvastádiumok hosszát adják meg órákban.

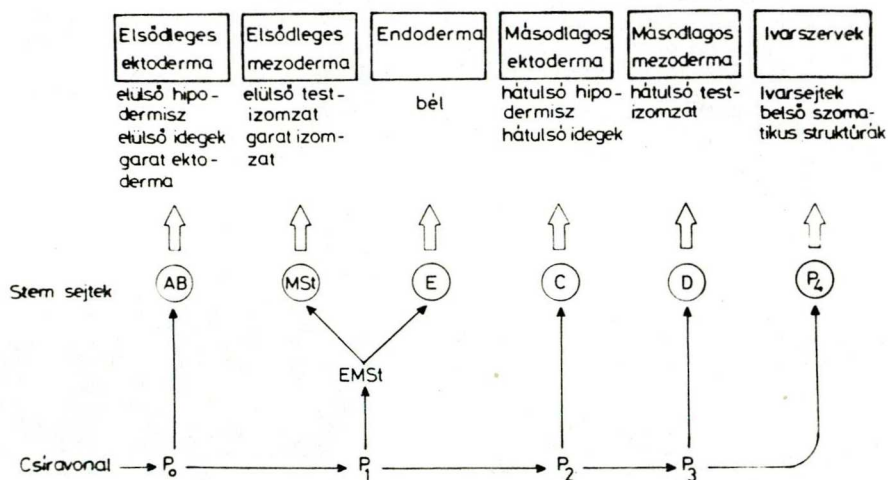
A növekedés sebessége 25 °C-on kb. 2,1-szerese a 15 °C-on mérhető értéknek. Egyedfejlődését posztembriális (Sulston és Horwitz, 1977; Sulston, 1976) és embriális (Deppe és mtsi, 1978; Schirenberg és mtsi, 1978) szakaszokon részletesen, **azaz** sejtszinten leírták. A cambridgei és göttinge-



ni kutatók közös munkájának eredményeként gyakorlatilag az adult valamennyi szomatikus és gonádsejtjének eredetét, sejtfaát, ("cell lineage"-t) ismerjük (Schirenbeg és Sulston, 1980). Ezeket a vizsgálatokat az tette lehetővé, hogy az állat valamennyi sejtje csaknem az egyedfejlődés teljes szakaszán un. Nomarski optikával látható, lehetőség van az így nyert képek rögzítésére, az eredmények számítógépes analizisére és elektronmikroszkópos képekkel való összevetésére. Régi megfigyelést (Boveri, 1892) erősítettek meg ezek a vizsgálatok: az egyedfejlődés igen konzervatív, a sejtek osztódásának száma és az utódsejtek pozíciója állatról állatra invariábilis, sőt, a sejtosztódások időpontját perc pontossággal megismerhetjük. A 25 °C-on mindössze 11,5 órát igénylő embrionális fejlődés egy kb. 4 óra tartamu proliferációs, s az azt követő morfogenetikai szakaszra tagolódik. Először egyenlőtlen, aszinkron sejtosztódásokkal un. őssejtek vagy stem-sejtek alakulnak ki (3. ábra). Ezek azután a stem-sejtre jellemző időközökben és számban szinkron, szimmetrikus osztódásokkal különböző szöveteket hoznak létre. Így a proliferációs szakasz végére kb. 550 sejtés ébrény alakul ki; ebben például 32 sejt az izomzat őse, egy-egy sejt a him illetve női csiravonal őse, egy-egy pedig a him illetve női gonád őssejtje. Az első stádiumos (L1) lárva 550 sejtől áll, ez a sejtszám himnőseknél 810-re, himeknél 940-re megy fel. A himnősben termelt petesejteket a spermatárolóban vagy a saját, vagy a him által (a vulván át) bejuttatott spermiumok termékenyítik meg. Az emriófejlődés

azonnal megindul, noha a két sejtmag csak később egyesül. A fiatal (55-65 órás) adult petéit kb. 30-32 sejtes stádiumban rakja le.

A posztembrionális fejlődés négy, egymástól kétórás nyugalmi periódussal és vedléssel elválasztott lárvaszakaszban (L1-L4) zajlik le 48-50 óra alatt. Közben kiegészülnek a szomatikus struktúrák (elsősorban az ivarérett állat nemi funkcióihoz szükséges izom és idegelemekkel), illetve a közel 2000 csirasejt differenciálódik.



3. ábra C. elegans szöveteinek differenciálódása a stem-sejtekből. (Schierenberg nyomán)

Oocitát az állat egész élete során termel, a spermiumképződés azonban befejeződik a lárvaélettel, így az utódszámot a spermatárolóban lévő himivarsejtek száma limitálja.

Az utódszám önmegtermékenyülés esetén 250-350 között lehet.

Kedvezőtlen környezeti feltételek között alternatív fejlődési mintázat észlelhető: az L2 lárvák szemianabiótikus tartós lárvává (dauer-lárvává) alakulnak. Ebben az állapotban nem táplálkoznak, és hónapokig életképesek. A szájüreg zártsága és a kutikula speciális szerkezete ellenállóvá teszi ezeket a lárvákat pl. detergenssekkel szemben is (Cassada és Russell, 1975). Kémiai inger (táplálék) hatására az állatok L4 lárvákká vedlenek, ez a folyamat irreverzibilis. Dauer-lárvákkal könnyen és jól szinkronizálható a populáció. Élettanilag pedig a dauerek a növényparazita fonalférgek infektív lárváinak megfelelői.

1.3. A C. elegans szaporodása

A C. elegans a természetben mint önmegtermékenyítő hermafrodita szaporodik. A himnős állat termel mind petesejteket, mind spermiumokat. Természetes populációkban a hermafroditák utódai között kb. 0,3 %-os gyakorisággal fordulnak elő hímek is, s ezek morfológiailag jól elkülöníthetők a himnősektől. A hímek párzószerük segítségével a hermafroditákat meg tudják a vulván keresztül termékenyíteni, és keresztutódokat hoznak létre. Egy-egy himnős keresztutóda-
inak száma akár 800-1000 is lehet. A hímeknek csak egy ivari kromoszómájuk (X) és öt pár un. autoszómájuk (A) van (XO;5AA), míg a hermafroditáknak az öt pár autoszóma mellett két X kromoszómájuk van (XX;5AA) (Nigon, 1949). Mivel a keresztutódok fele hím, ezért a hímek és a hermafroditák

filyamatos keresztezésével fenntartható sok himet produkáló törzs.

1.4. A C. elegans mint genetikai objektum

Az állatok kétféle szaporodásmódja nagyon előnyös a genetikai analízis szempontjából. Az önmegetermékenyítő szaporodásmóddal az állatok utódpopulációi gyorsan homozigótáká tehetők; igen könnyű izogén vonalakat létrehozni. Új recesszív mutációk izolálása ugyancsak egyszerű, mivel a mutációra kezdetben heterozigóta egyed utódai között automatikusan szegregálódnak homozigóták, így a mutáns fenotípus detektálható anélkül, hogy hosszadalmas édestestvér keresztezéseket kellene végezni. Az önmegetermékenyítő szaporodásmódnak köszönhetően a C. elegans számos olyan mozgássérült mutánsai, amelyek mechanikai okok miatt nem tudnak párosodni, de egyébként fertilisek, szaporíthatók.

Minden genetikai munkának (géntérképezés, komplementációs analízis, stb.) része a gének átvitele egyik egyedből a másikba. A hímek révén ez a C. elegansnál is lehetséges.

Molekuláris genetikai kutatások szempontjából előnye a C. elegansnak viszonylag kis genomja. Haploid DNS tartalma sejtenként 8×10^7 bázispár, ami kb. 20-szor nagyobb az E. coli genomjánál. DNS-ének kb. 83 %-a egyedi (unique) szekvencia (Sulston és Brenner, 1974). A 2000 strukturgén ma mintegy 10 %-ának (250 gén) alléljeit illetve genetikai lokalizációját ismerjük. Ezek zöme látható (alig több, mint 20-féle) fenotípusváltozást okoz; ezekre a genom te-

litett. Az eddig megismert látható és indiszpenzibilis funkciójú gének nem egyenletesen oszlanak el az egyes kromoszómákon, hanem csoportokat (klasztereket) alkotnak.

A C. elegans anatómiai, élettani és genetikai egyszerűsége lehetővé teszi az egyedfejlődés teljes programjának, valamint olyan magasan szervezett struktúrák működésének megértését, mint az idegrendszer és az izom működése.

2. Az egyedfejlődésben szerepet játszó gének jellemzése

A C. elegans fejlődésében, szaporodásában, sejt és szupracelluláris fiziológiai folyamataiban szerepet játszó indiszpenzibilis funkciójú gének száma alacsony : becslések szerint kb. 2000 (Brenner, 1974). Reális remény van tehát arra, hogy legtöbbjüket azonosítani, szerepüket, működésük szabályozásának elveit megismerhessük. Mivel az állatok felépítése viszonylag egyszerű, a fejlődési mintázat pedig konzervatív, így lehetőség nyílhat a teljes genetikai program, a differenciális génexpresszió részletei, a kompartmentalizáció biokémiai alapjainak feltárására. Az egyedfejlődés logikájáról, szekvenciális eseményeiről megfelelő fejlődési mutánsok analízisével kaphatunk információkat.

2.1. Kondicionált letális mutációk

Az egyedfejlődésben szerepet játszó gének mutációinak zöme letális, vagy kondicionált letális. Az eszenciális gének mutációinak azonosítására egyik elterjedt megköze-
lítés az az, hogy a letális mutációkat a letális fenotípus alapján vizsgáljuk. A letális mutációk azonosítására egyik elterjedt megköze-

tés kondicionált letális vagy steril mutánsok izolálása, melyek közül a hőérzékeny mutánsok a leginkább használatosak. Hőérzékeny mutánsokat használtak már fel genetikai analízis céljaira mind prokariotákban (pl. Edgar és Lielausis, 1964; Jarvik és Botstein, 1975), mind eukariotákban (Suzuki és mtsi., 1976; Hartwell, 1974), beleértve természetesen a C. eleganst is (pl. Epstein és Thomson, 1974; Hirsh és Vanderslice, 1976; Riddle, 1977, 1980). Ezekre az jellemző, hogy a mutáns fenotípus (letálisok esetében: a halál) csak bizonyos (restriktív) körülmények között nyilvánul meg, míg permisszív körülmények között a vad típusu allél fenotípusa jut kifejezésre (Suzuki, 1970).

A permisszív hőmérséklet C. elegansnál 15-16 °C, a restriktív hőmérséklet pedig 25 °C. A kondicionált letálisok homozigóta formában tenyésztethetők, térképezhetők és komplementációval tanulmányozhatók. A kondicionált letális allélekkel jelölt gének időbeli és térbeli fókuszálására, azaz elsődleges hatóhelyének és aktív szakaszának (fenokritikus szakaszának, elvben a termoszenzitiv periódusának, vagy TSP) megállapítására van lehetőség.

Bizonyos tényezők azonban bonyolítják a kondicionált letálisokkal végzett analízist. Ilyen pl. az embriogenezis korai szakaszában érvényesülő anyai hatás, ami bizonyos gének hibáinak következményeit elfedheti. Számos esetben eltérő egy-egy géntermék keletkezésének (génexpresszió) és felhasználásának időpontja, s így a mérhető (pl. TSP) és a valószínű fenokritikus periódus nem feltétlenül esik egybe. Ezenkívül bizonyos mutációk nem teljes recesszív (hipomorf)



jellege is zavarhatja az egyértelmű kiértékelést (Meenly és Herman, 1979; Garcia-Bellido, szóbeli közlés).

2.2. Recesszív letális mutációk

A felsorolt nehézségek miatt a fejlődésgenetikai kutatásokban előnyben részesülnek az un. "null-allélek" és a kis deléciók, melyek segítségével megbízhatóbban lehet hiányzó génproduktumok azonosítása. Az ilyen recesszív letális mutánsokkal kapcsolatosan két probléma merül fel. Az első a mutánsok fenntartása. A heterozigóta hermafrodita autoszegregációs utódainak kétharmada heterozigóta a letális allélra, míg egyharmada homozigóta a normális allélekre. Így a törzset állandóan szelektálni kell a heterozigótákra, ami nem mindig oldható meg könnyen, sokszor állandó utódtesztet igényel. Ezt elkerülhetjük, ha a kérdéses gén normális allélját hordozó kromoszómát *cisz* helyzetben megjelöljük egy szorosan kapcsolt - látható - recesszív mutációval. Így a letális allélt is hordozó, valamint a homozigóta vad típusu utódok könnyen megkülönböztethetők, mivel az utóbbiakban a recesszív marker-mutáció fenotípusa megnyilvánul.

A másik probléma a letális mutánsok genetikai térképezésénél és komplementációs analízisének jelentkezhetsz. Mivel valamennyi komplementálandó mutánst szükségszerűen heterozigóta törzsben tartunk fenn, ezért a komplementációs analízishez meg kell jelölni a letális alléleket egy-egy, szorosan kapcsolt *cisz* helyzetű, recesszív, látható mutáci-

óval, mert ez az egyetlen lehetőség a transz heterozigóták felismerésére. Ha pl. "c" a jele egy recesszív látható, "a" és "b" pedig egy-egy komplementálandó recesszív letális mutációnak, akkor a transz heterozigóta C fenotípusának megjelenése, vagy hiánya F_1 -ben az "a" és "b" komplementációviszonyaitól függ. A jelölésekre szükség van mind a kétfaktoros, mind a háromfaktoros térképezésekben is. Nyilvánvaló, hogy a letális allélek jelölésére használt mutációk és azok vad alléljai - ha kis mértékben is - rekombinálódni fognak, így elvesztik szerepüket, és elveszhet a letális allél is. Ennek kiküszöbölésére a kromoszóma-átrendeződések rekombinációt csökkentő szerepét használhatjuk fel. Ezt a technikát elsősorban a Drosophila genetikusok dolgozták ki (lásd pl. Roberts, 1976)

2.3. A balanszer kromoszóma

Az alábbiakban megkísérlem összefoglalni a rekombinációt gátló un. balanszer kromoszómákkal kapcsolatos ismereteink rövid összefoglalását, elsősorban Lindsley és Grell (1968) könyve alapján.

Balanszer néven foglalkozunk össze mindazon kromoszóma-átrendeződéseket, amelyek csökkentik, vagy gátolják a genetikai rekombináció gyakoriságát a genom egy velük homológ régiójában, heterozigóta állapotban. Közös vonásuk, hogy tartalmaznak általában legalább egy látható fenotípusu domináns, és egy, vagy több recesszív mutációt. A balanszer kromoszóma lehet inverzió, szabad duplikáció és transzlokáció eredménye is. Osztályozásuk az átrendeződések termé-

szete, az átrendeződött kromoszómák, valamint letalitást okozó tulajdonságuk alapján történik.

Inverziós balanszerek közül leghasználatosabb típusok a következők: (a) "Basc" típus esetén mindkét ivar életképes és fertilis; (b) "Binsn" típusnál a hemizigóta him életképes és fertilis, a homozigóta nőstény steril; (c) "ClB" típusuaknál a heterozigóta nőstény életképes. Autoszómás balanszerek között vannak olyanok (pl. SMI, TM3), melyek több inverziót tartalmaznak, így az adott kromoszóma teljes hosszában gátolt lehet a rekombináció.

Transzlokációs balanszerek nem homológ kromoszómák terminális darabjainak kölcsönös kicserélődésével jönnek létre. A transzlokálódott szegment és az eredeti kromoszóma között a genetikai rekombináció gyakorisága elhanyagolható, ami főleg a kromoszómák párosodási nehézségeivel magyarázható. Rekombináció gátlás szempontjából tehát csak a heterozigóta transzlokációk jöhetnek számításba. A transzlokációkra általában rendellenes meiotikus szegregációs mintázat jellemző, ami az eredeti és az átrendeződött kromoszómák közötti eltérő párosodás következménye. Elméletileg a következő háromféle hasadási típus létezik: "alternate", "adjacent-1" és "adjacent-2". Ezek eredményeként aneuploid és ortoploid gaméták képződnek, melyek életképesek, de az egyesülésükkel képződő zigóták nagy része életképtelen (lásd pl. Roberts, 1976). Szintén meiotikus zavarokra utal az X-autoszóma transzlokációkat gyakran kísérő X kromoszóma non-diszjunkció jelensége, melynek eredményeként megnőhet a hímek (hemizigóták) aránya az utódok között.

Drosophilában szinte valamennyi lehetséges balanszer típust előállították; ennek elvi akadálya nincs. Továbbiakban ismertetem a C. eleganson izolált balanszer kromoszómákat. Eddig 17 átrendeződést azonosítottak, melyek zöme az X kromoszóma valamely régióját magába foglaló transzlokálódott, vagy szabad duplikáció. Ezeket parciális triploid (duplikációs heterozigóta), vagy parciális tetraploid (duplikációs homozigóta) formában tartják fenn, attól függően, hogy van-e a duplikációnak letális illetve sterilitást okozó effektusa. A szabad duplikációk rekombináció gátló hatása csak a velük homológ szakaszokra szorítkozik, míg a transzlokálódott darabok ezen felül azon a kromoszóma karon is hatékonyak, amelyre áthelyeződtek.

ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

1. Anyagok

a) NG agar: 3 g NaCl-t, 2,5 g bactopectont (Difco) és 17 g bacto-agart (Difco) kell oldani 975 ml desztillált vízben, majd az oldatot autoklávozni kell. Ezután 1 ml etanolban oldott koleszterolt (5 mg/ml), nisztatint, 1 ml 1 M CaCl-t, 1 ml 1 M MgSO₄-t és 25 ml 1 M K-foszfát puffert (pH 6.0) adunk hozzá a felírt sorrendben. Ez Brenner (1974) médiumának kissé módosított változata.

b) M9 puffer oldat: 6 g Na₂HPO₄-t, 3 g KH₂PO₄-t, 5 g NaCl-t és 0,25 g MgSO₄·7H₂O-t oldunk egy liter desztillált vízben, és autoklávozzuk.

2. Nematoda törzsek

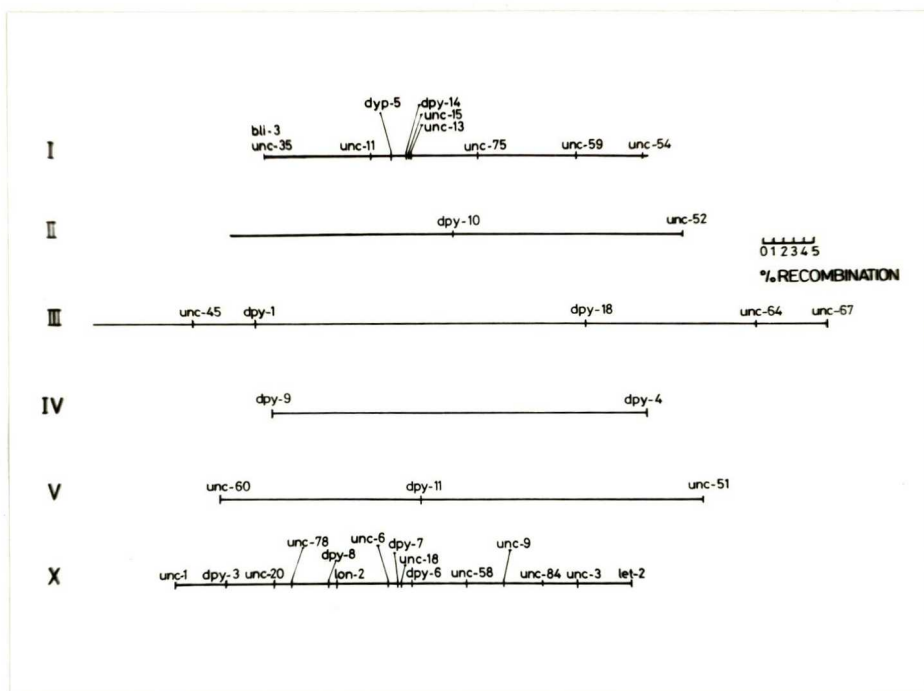
Laboratóriumunkban meglévő C. elegans var. Bristol vad típusu (N2) és mutáns törzseit S. Brennertől kaptuk. A különböző törzsek elnevezésében a nematodákra leírt egységes genetikai nomenklaturát követjük (R. Horvitz és mtsi, 1979).

(A különböző gének megjelölésére három betűből és arab számokból álló nevet használnak. A három betű a génre jellemző fő fenotípus-kategória rövidítése, a számok pedig az azonos kategórián belüli gének megkülönböztetésére szolgálnak. Például "unc-54" egy olyan génnek a neve, melynek hibája rendezetlen (uncoordinated) mozgást eredményez.

Mivel csaknem minden génnek több alternatív változata

létezik, ezért szükséges feltüntetni a felhasznált alléleket is. Az unc-54(e190) és az unc-54(e1301) jelöléssel az unc-54 gén két allélját különböztetjük meg. A vad típusu gén jelölése: unc-54⁺, vagy unc-54(+). Római számokkal jelöljük az adott gént hordozó kromoszómát (X; I-V). A nomenklaturának megfelelően az állatok fenotípusát a dolgozatban mindig nagybetűvel írom (DPY=dumpy, UNC=uncoordinated, LON=long).

A dolgozatban szereplő látható mutánsok kapcsoltsági viszonyait mutatja a 4. ábra.



4. ábra A dolgozatban említett gének kapcsoltsági viszonyai. Brenner, (1974) nyomán.

A felhasznált allélek a következők: bli-3(e767), unc-35(e259), unc-11(e47), unc-75(e950), unc-59(e261), unc-54(e190), dpy-10(e223), unc-52(e444), unc-45(e296), dpy-1(e1), dpy-18(e364), unc-64(e246), unc-67(e713), dpy-9(e12),

dpy-4(e1166), unc-60(e677), dpy-11(e224), unc-51(e369),
unc-1(e94), dpy-3(e27), unc-20(e112), unc-78(e1217), dpy-8
(e1321), dpy-8(e60), lon-2(e678), unc-6(e78), dpy-7(e88),
unc-18(e174), dpy-6(e14), unc-58(e665), unc-9(e101), unc-84
(e1412), unc-3(e151), let-2(e1470).

A himeket folyamatos N2 him x N2 hermafrodita testvér-
keresztezésekből nyertük.

3. Törzsek fenntartása, keresztezések, rekombinációs érté- kek számolása

Genetikai és egyéb kísérletekhez az állatokat 18 °C-os
szobában monoxénikusan, 9 cm átmérőjű petricsészékbe öntött
NG agaron tartjuk, melyhez *E. coli* OP50 baktériumot adunk
(Brenner, 1974). Ez utóbbi a táplálékforrás a fonalférgek
számára. A hosszabb ideig nem használt törzseket folyékony
nitrogénben tároljuk, ennek metodikája Brenner (1974) cik-
kében található.

A keresztezéseket petricsészékben (4 cm átmérőjű) végez-
tem. Az állatokat egyenként vékony, hővel sterilizett pla-
tinatüvel raktam lemezekre. Egy-egy lemezre 4-5 hermafrodi-
tát és 15-25 himet tettem, a kísérlettől függően. A himeket
általában 1-2 nappal a keresztezés után eltávolítottam, a
petéző hermafroditákat pedig naponta friss lemezre tet-
tem. A termoszenzitív mutánsokat 24,5 °C-on tartottam, a
keresztezéseket is ezen a hőmérsékleten végeztem. Az utó-
dokat a keresztezést követő 2-4. napon számoltam és osztá-
lyoztam.

A különböző kettősmutáns törzseket a Brenner (1974) ál-

tal leírt módszerrel állítottam elő.

A peterakás és a peteletalítás mértékét a következő -
képpen határoztam meg: 10-10 hermafroditát 4 cm Ø petricsé-
székbe raktam, melyek pepton szegény NGM-et tartalmaztak.
Előzőleg vékony csikban E.coli szuszpenziót szélesztettem
ki. Az állatokat 4 órán át petéztettem, majd eltávolítva
őket, megszámoltam a baktérium pázsitra lerakott petéket.
(Gyakorlatilag az összes pete itt található) Az utódokat
1-3 nappal később számoltam.

Az állatok illetve a peték megfigyelését és számolását
Zeiss sztereomikroszkóp segítségével végeztem.

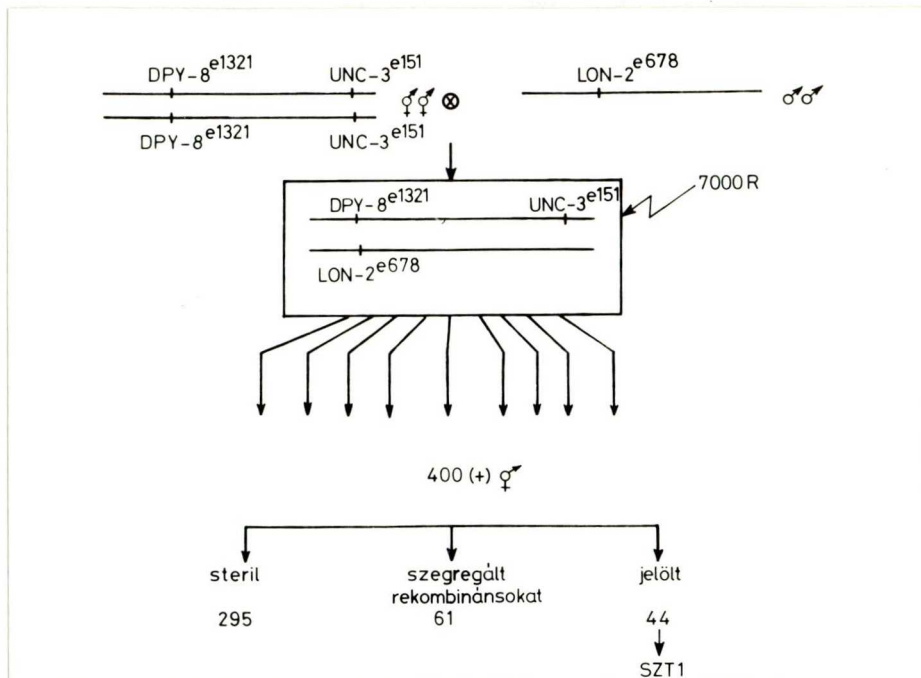
Rekombinációs és az un. "pszeudolinkage" értékeket
(lásd EREDMÉNYEK) cisz heterozigóták utódainak leszámolása
után határoztam meg, Brenner (1974) leírása alapján.

4. Balanszer kromoszóma izolálása Röntgen-sugárzással

R. Herman (1978) módszerének felhasználásával izoláltam
rekombinációt gátló átrendeződést az X kromoszómán. Az el-
különítés elvi alapja az, hogy rekombináció gátló átrende-
ződés jelenlétére homológ kromoszómáin három megfelelő
pontban jelölt (transzheterozigóta) szülő utódai között a
rekombinációs kategóriák hiányából lehet következtetni. Az
izolálási kísérlet sémáját mutatja az 5. ábra.

Petéző dpy-8 unc-3 hermafroditákat lon-2 hímekkel ke-
resztezttem. Egy nap elteltével a hermafroditákat friss le-
mezre raktam át, és egy napig petéztettem őket, a hímeket
pedig eltávolítottam. A keresztezésből származó utódok ge-





5. ábra X kromoszómás balanszer izolálási sémája
(magyarázat a szövegben)

notipusa dpy-8 + unc-3/+ lon-2 +, fenotipusa pedig vad. Így könnyen megkülönböztethetők az autoszegregációból származó kettősmutáns utódoktól. 50 - az előbbi keresztezésből származó - 55-60 órás vad típusu hermafroditát Röntgen-sugárzással kezeltem (7000 R, 1000 R/perc, 10 cm távolság, 0,5 mm Al-szűrő). 10-10 besugárzott állatot 4 óra múlva petegyűjtő lemezekre raktam át, majd egy nap elteltével eltávolítottam őket. 400 vad típusu F₁ állatot egyenként külön agarlemezre tettem, ezek utódait megvizsgáltam. A cél az volt, hogy olyan lemezt találjak, melyen csak DPY UNC és normális illetve LON egyedek vannak. 295 lemezen az állatok sterilek voltak, 61 lemezen a vad típusuakon kívül találtam rekombináns, vagyis csak DPY, vagy csak UNC állato-

kat. Ezek közül több lemezen nem volt DPY UNC utód, ezeken természetesen már az F_1 hermafrodita rekombináns volt. 44 lemezen nem találtam rekombinánsokat, azonban a lemezek többségén kevés, csak 10-15 F_2 utód volt. Ezeken a lemezeken az F_3 és F_4 generációt is megvizsgáltam, végül egyetlen lemez maradt, melyen továbbra sem találtam rekombináns egyedet. Kettősmutánssal való visszakeresztezés után törzset indítottam, amit azóta 8-10 naponként vad típusu hermafroditák új lemezre rákásával tartunk fenn. A törzs jelölését a későbbi vizsgálatok (lásd EREDMÉNYEK) után, valamint az új nevezéktan (R. Horvitz és mtsi., 1979) figyelembe vételével SZTl-nek adtuk meg.

5. EMS-el indukált letális mutációk izolálása

A mutagenézist Brenner (1974) által leírt módon végeztem. Fiatal SZTl hermafroditákat NGM agarlemezről M9 pufferrel lemostam, majd ülepedés után 3 ml M9 pufferbe vittem át, és a szuszpenzióhoz 1 ml frissen készített 0.2 M-os EMS oldatot adtam (végkoncentráció 0.05 M). Az állatokat szobahőmérsékleten 4 órán át tartottam az oldatban, majd ismételt leülepités és M9 pufferrel történő átmosás után pipettával NGM agarlemezre vittem át őket. Az élő vad típusu hermafroditákat platina tűvel friss lemezre raktam át. 6-8 óra múlva petegyűjtő lemezekre kerültek, minden lemezre egy állat. Egy-egy mutagenizált szülőnek 5-10 F_1 utódját egyenként külön-külön lemezre tettem, és az F_2 nemzedékben DPY UNC hermafroditák hiányára szkrinéltem.

6. Kromoszóma festés

2 Fiatal hermafroditákat néhány percre baktérium-mentes agarlemezre tettem, majd kis vízcseppben tárgylemezre rak-
tam át. Az állatokat egy fedőlemezrel szétnyomtam, majd a preparátumot folyékony nitrogénbe mártottam néhány másod-
percre. A fedőlemez lepattintása után Herman (1979) által leirt fixálási és festési eljárást követtem. A preparátu-
mot Carnoy fixáló oldatba (6 rész etanol, 3 rész kloroform, 1 rész ecetsav) tettem 30 percre, majd 50 %-os etanollal és 0.15 M NaCl, 0.03 M KCl és 0.01 M K-foszfát (pH 7) puf-
ferrel történő lemosás után 1 μ g/ml-es Hoechst 33258 fluo-
oreszcensz festékkel 20 percig festettem. A gyorspreparátum elkészítése után a kromoszómákat fluoreszcensz lámpával felszerelt Leitz ORTHOPLAN mikroszkóppal vizsgáltam. A fel-
vételek elkészítéséhez BG-12, UG-1 szűrőket és ILFORD HP5 27 dines filmet használtam.

EREDMÉNYEK

1. Crossing-over szupresszor azonosítása az X kromoszómán

Az 1. táblázatban foglaltam össze a dpy-8 + unc-3/+lon-2+ hermafrodita szülők utódainak különböző fenotípus szerinti megoszlását.

1. TÁBLÁZAT

dpy-8 + unc-3/+ lon-2 + genotípusu hermafroditák utódai

törzs	utódok fenotípusa				
	vad	lon	dpy unc	dpy	unc
Kezeletlen szülők	388/0	210/0	176/0	110/0	93/0
SZT1	1181/0	0/208	308/107	0/0	0/0

A törtvonal előtt a himnősek, mögötte pedig a himek számát adtam meg.

Noha az UNC fenotípusu utódok hányada valamivel kevesebb az elméletileg vártnál, a rekombinánsok (DPY és UNC) gyakorisága az ismert genetikai térkép (Brenner, 1974) alapján várt értékeknek megfelelő. A DPY és az UNC utódok előfordulási gyakorisága (21 %) a két pont térképtávolságával arányos, és a dpy-8 valamint az unc-3 pontok közötti crossing-over eredménye. Az SZT1 törzset dpy-8 + unc-3/+ lon-2 + szülők Röntgen-sugár kezelése után szelektáltam, annak alapján, hogy a be nem sugárzott szülőkkel el-

lentétben nem szegregáltak sem DPY, sem UNC utódokat. Meglepetésre LON hermafrodita utódaik sem voltak, ellenben 10-15 % LON és DPY UNC him utóduk volt (lásd 1. táblázat).

A crossover szupresszor lokalizációjának megállapítására SZT1 hermafroditákat lon-2/0 hímekkel, az SZT1 (LON) hímeket pedig kezeletlen dpy-8 unc-3 homozigóta himnősekkel kereszteztem. A vad típusu hermafrodita utódokat egyenként lemezre raktam, és ezek utódait megvizsgáltam. A fenotípus megoszlást mutatja a 2. táblázat.

2. TÁBLÁZAT

SZT1 X kromoszómáit hordozó hermafroditák utódainak megoszlás viszonyai

törzs	utódok fenotípusa				
	vad	lon	dpy unc	dpy	unc
(SZT1)lon-2 dpy-8 unc-3	602/0	0/69	154/47	1/0	0/0
(SZT1) dpy-8 unc-3 lon-2	292/0	139/0	121/0	78/1	71/0

A törtvonal előtt a himnősek, mögötte pedig a hímek számát adtam meg.

Számomra mindkét keresztezésből azok az utódok voltak érdekesek, amelyek mind a dpy-8 unc-3 -al, mind a lon-2 -vel jelölt kromoszómát hordozták, mert ezen kromoszómák egyike



(első esetben a dpy-8 unc-3, másodikban a lon-2), az SZT1 törzsből származott. A crossover szupresszor jelenlétét úgy ellenőriztem, hogy megállapítottam a DPY és az UNC állapotok frekvenciáját a hibridek utódpopulációiban. Az eredmények azt mutatják, hogy a crossover szupresszor mindig a lon-2 -vel jelölt kromoszómához kapcsolódik. A rekombináció gátlás az izolálási sémából adódóan domináns. Az SZT1 vad típusu hermafroditák további két sajátossága a magas zigóta-letalitás, valamint az utódok között a hímek előfordulásának magas gyakorisági értéke (10-15 %). A 2. táblázat mutatja, hogy a visszakeresztezések után az SZT1(lon-2) kromoszómát hordozó egyedek utódainak kevesebb, mint 0.1 %-a rekombináns.

Annak eldöntésére, hogy az SZT1 törzs különleges viselkedésében csak az X kromoszóma állapota játszik-e szerepet, vagy más kromoszómáé is, a törzsből spontán kihasadó LON hímeket kereszteztem öt különböző kettősmutáns hermafroditával. E kettősmutánsok homozigóták voltak az unc-3 gén egy mutációjára, és egy-egy - különböző autoszómákhoz kapcsolt - dpy mutációra. A vad típusu hermafroditákat kiemeltem, és megszámláltam a LON, DPY, UNC és DPY UNC hím utódokat. (A hermafroditáknál torzítja a számarányokat az a tény, hogy a lon-2 homozigóták életképtelenek.) Az eredményeket a 3. táblázat foglalja össze. Egyetlen eset kivételével a LON és a DPY, illetve az UNC és a DPY UNC fenotípusu hím utódok aránya megfelelt a szabad kombináció alapján elméletileg várható 3:1 arálynak. A kivételt az unc-3 dpy-5 (I)/(SZT1)lon-2 hermafroditák képvi-

3. TÁBLÁZAT

Az X kromoszóma és az autoszómák kapcsoltsági viszonyai Bal-X-1 kromoszóma jelenlétében.

törzsek	him utódok fenotipusa			
	VAD	DPY ⁺	UNC	DPY UNC
(SZT1) lon-2 unc-3; dpy-11	V. 554	161	371	109
(SZT1) lon-2 unc-3; dpy-4	IV. 159	48	70	24
(SZT1) lon-2 unc-3; dpy-1	III. 226	76	162	49
(SZT1) lon-2 unc-3; dpy-10	II. 204	61	133	38
(SZT1) lon-2 unc-3; dpy-5	I. 202	-	45	79

⁺ A DPY fenotipusu egyedek genotipusa lon-2/0; dpy/dpy, azonban a dpy gén elnyomja a lon megnyilvánulását (recesszív episztázis)

selték; ezek utódai közül hiányzott az egyik rekombináns (DPY) fenotipusu him kategória. Ez arra utal, hogy a heterozigóta anyában a lon-2(X) és a dpy-5⁺(I) szorosan kapcsoltak, ebből következően az SZT1 törzs egy X és I. kromoszóma közötti transzlokációt tartalmaz.

Mivel az SZT1 törzsben lévő és lon-2 -vel jelölt kromoszóma-aberráció (nevezzük a továbbiakban Bal-X-1 -nek)

jelenlétében a homológ X kromoszómán lévő *unc-3*, és a (nem SZT1 eredetű) I. kromoszómán lokalizált *dpy-5* gén nem rekombinálódik, alkalmas markereknek látszanak a további vizsgálatokhoz.

A munkahipotézis az volt, hogy a Bal-X-1 kromoszóma két komponensből (egy X eredetű T^X -ből, és egy I. kromoszómából származó T^1 -ből) áll, melyek befolyásolják a Bal-X-1 kromoszóma sorsát a meiosis során. Tételezzük fel, hogy T^1 és a normális I. kromoszóma szétválása független T^X és a normális X szétválásától. Más szóval az "alternate" és az "adjacent-1" típusu szétválás egyenlő valószínűségű, az "adjacent-2" típusu hasadás valószínűsége pedig elhanyagolhatóan kicsi (Roberts, 1976).

A 6. ábra azt mutatja, milyen genotípusu gaméták és milyen genotípusu zigóták várhatók a (SZT1) *lon-2 +/+ unc-3; dpy-5/+* hermafroditák autoszegregációjából. Az aneuploid (T^1 -t hordozó - T^X hiányos, vagy T^X -et hordozó és T^1 hiányos) gaméták egyesülhetnek és életképes zigótákat hozhatnak létre; a csak T^1 -t vagy csak T^X -et tartalmazó zigóták viszont életképtelenek.

A hipotézis helyességét ellenőrző kísérletben 50 vad típusu (SZT1) *lon-2 +/+ unc-3; dpy-5/+* heterozigóta himnős utódait teszteltem le. Vad típusu és DPY UNC himnős utóda mindegyiknek volt, más fenotípusu viszont nem, ami azt jelenti, hogy a T^1/T^1 ; $T^X/unc-3$ és a $T^1/dpy-5$; T^X/T^X zigóták valóban életképtelenek.

him- ivarsejt pete	T ^I T ^x	UNC-3 DPY-5	T ^x DPY-5	UNC-3 T ^I
T ^I T ^x	+	V	+	+
UNC-3 DPY-5	V	UD	+	+
T ^x DPY-5	+	+	+	V
UNC 3 T ^I	+	+	V	+

6. ábra Az utódok elméletileg várható autuszegregációja a (SZT1)lon-2 +/- unc-3; dpy-5/+ hermafroditákból. Jelölések: V=vad típusu, UD=unc dpy, +=életképtelen zigóta.

A 6. ábrán látható, hogy a zigótáknak 5/16-a volt életképes. Ezt úgy igazoltam, hogy megszámoltam a lerakott petéket és a kifejlődött állatokat; azt tapasztaltam, hogy az SZT1 törzs által rakott petéknek csak kb. 1/3-a kelt ki (lásd 4. táblázat).

A ki nem kelt, de zigótákat tartalmazó peték még 2-3 nappal a lerakás után is számolhatóak, mivel ezeket ellenálló hártya (corion) burkolja. Ezzel ellentétben a megtermékenyítetlen peték a lerakás után néhány perccel szétfolynak (Hirsh és Vanderslice, 1976).

4. TÁBLÁZAT

dpv-8 + unc-3/+ lon-2 + hermafroditák petéinek kelési gyakorisága és utódszáma

törzs	kelési gyakoriság	átlagos ⁺ utódszám
Kezeletlen szülők	703/707	311 (5)
SZT1	385/1233	94 (8)

⁺Zárójelben azoknak az állatoknak a száma szerepel, amelyeknek az utódait számoltam.

A 6. ábrán látható, hogy elméletben a transzlokációs heterozigóta : nem transzlokációs típus aránya 4:1, s adataim ezzel jó egyezést mutatnak (lásd 1. táblázat).

Az SZT1 törzsben transzlokációs homozigótákat (LON himnőseket) nem találtam. Ez a recesszív letalitás nem szegregál lon-2 -től, és mivel a (feltehetően T^1/I ; $T^Xlon-2/0$ genotípusu) spontán kihasadó LON hímek életképesek és fertilisek, feltételezhető, hogy a hiba a T^1 kromoszómán van. Hogy ez a hiba magának a transzlokációnak a sajátja-e, vagy egy másik Röntgen-sugár által indukált változás következménye-e további vizsgálatok során dönthető el.

A Bal-X-1 kromoszóma hatásosan gátolja a rekombinációt az X kromoszóma kb. kétharmadán, a dpy-8 -tól jobbra, és szoros kapcsoltságot mutat dpy-5 -el. Annak a kérdésnek

a megválaszolására, hogy az I. kromoszómának mekkora szakasza van "pseudo-linkage"-ben a lon-2 génnel az SZT1 törzsben, megvizsgáltam több X és I. kromoszomás gén rekombinációs viszonyait. Az adatokat az 5. táblázat tartalmazza.

5. TÁBLÁZAT

Rekombinációs értékek SZT1 kromoszómát hordozó hermafroditákban.

heterozigóta szülők	géntérkép számitott P	keresztelési adatokból szám. P
$\frac{+ (SZT1)lon-2 +}{dpy-8 + unc-6}$	0.06	0.003
$\frac{(SZT1)lon-2 + +}{+ dpy-7 unc-3}$	0.192	0.008
$\frac{(SZT1)lon-2 + +}{+ unc-58}; \frac{+}{dpy-5}$	0.5	0.001
$\frac{(SZT1)lon-2 + +}{+ unc-3}; \frac{+}{unc-15}$	0.5	0.016
$\frac{lon-2}{+}; \frac{+}{dpy-10} \frac{+}{unc-4}$	0.02	0.019-0.030
$\frac{(SZT1)lon-2}{+}; \frac{+}{dpy-10} \frac{+}{unc-4}$	u.a.	0.041-0.059
$\frac{lon-2}{+}; \frac{+}{dpy-4} \frac{+}{unc-26}$	0.035	0.038-0.045
$\frac{(SZT1)lon-2}{+}; \frac{+}{dpy-4} \frac{+}{unc-26}$	u.a.	0.050-0.064

heterozigóta szülők	géntérképből számított P	keresztelési adatokból szám. P
$\frac{(SZT1)lon-2}{+}; \frac{+}{dpy-17} \frac{+}{unc-69}$	0.048	0.058-0.067
$\frac{lon-2}{+}; \frac{+}{dpy-17} \frac{+}{unc-69}$	u.a.	0.046-0.057
$\frac{(SZT1)lon-2}{+}; \frac{+}{dpy-5} \frac{+}{unc-75}$	0.095	0.140

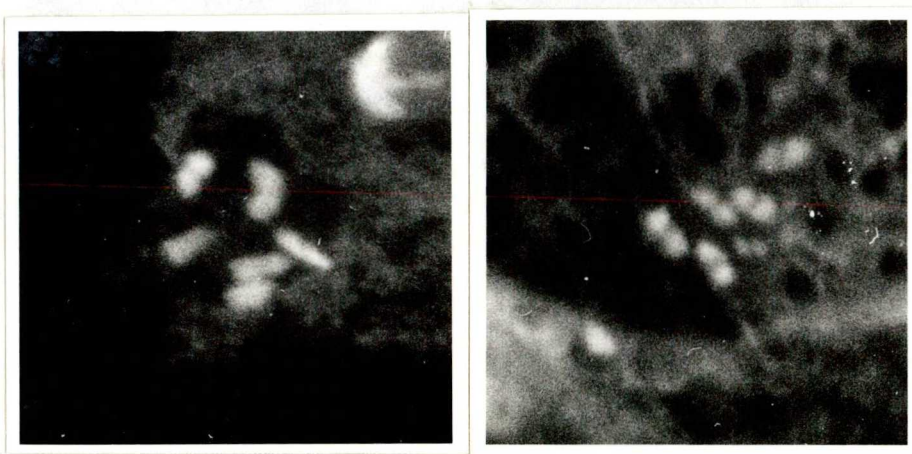
Az utódszám a felírás sorrendjében a következő volt: 873, 504, 654, 649, 1065, 1031, 1332, 1824, 977, 2056.

Látható, hogy néhány, a dpy-5 közelében lokalizált gén valóban szorosan kapcsolódik az X kromoszóma kiválasztott markerével. Ugyanakkor a dpy-5 -től jobbra, távolabb elhelyezkedő unc-75(e950) génnel kapcsolatban ezt nem tapasztaltam. Ezen adatok alapján arra lehet következtetni, hogy az I. kromoszómának viszonylag kicsi - a feltételezett centromer körüli szakasza vesz részt a transzlokációban, az ettől távolabbi markerekkel jelölhető szakaszok nem. A feltételezett töréspont az I. kromoszóma bal végén van.

Az átrendeződések interkromoszómális hatása a rekombinációra Drosophilában igen gyakori (Hinton, 1965; Lucchesi, 1976). Annak eldöntésére, hogy ez a jelenség a C. elegans-ban is így van-e, megvizsgáltam a különböző kromoszómákon a crossoverek gyakoriságát az SZT1 jelenlétében. A kapott eredményeket szintén az 5. táblázat tartalmazza. Látható, hogy a kromoszóma-átrendeződés megnövelte a rekombináci-

ót a II., III. és IV. kromoszómás gének között is.

Herman (1979) által izolált kromoszóma-átrendeződések közül több citológiailag is kimutatható. Ezért, valamint a keresztezési adatok esetleges alátámasztása végett, Hoechst 33258 festés után fluorescens mikroszkóppal megvizsgáltam az SZT1 törzs vad típusu hermafroditáinak oocitáiban a prometafázisos kromoszómákat (7. ábra)



7. ábra Hoechst 33258 festékekkel kezelt C. elegans kromoszómák fluorescens mikroszkóppal vizsgálva. a) N2 himnősek kariotipusa. b) SZT1 himnősek kariotipusa. Nagyítás: 2000x.

A kontrollként szereplő N2 himnős állatok oocitáinak kariotipusa 6 közel azonos nagyságu bivalens kromoszómából áll, ez megegyezik a kapcsoltsági csoportok számával (Brenner, 1974). Az SZT1 heterozigóták kromoszómái közül egy jóval kisebb a többinél, melyek azonos nagyságúak. Az utóbbi citológiai fenotípus minden bizonnyal a transzlokáció következménye.

2. A Bal-X-1 kromoszóma alkalmas recesszív letális mutációk kiegyensúlyozására

A rekombinációt gátló kromoszómák izolálásának egyik célja az, hogy recesszív letális mutációkat lehessen segítségükkel heterozigóta törzsben változatlanul fenntartani. Annak eldöntésére, hogy az SZT1 törzs alkalmas-e erre, vagy sem, X kromoszómás látható fenotípusu markerekhez (dpy-8, unc-3, unc-58) kapcsolt recesszív letális mutációk izolálását és fenntartását próbáltam meg segítségükkel. E célból Bal-X-1 heterozigótákat EMS illetve 1,2,7,8-diepoxioktán (DEO) kezelésnek vetettem alá. Az EMS kezelt állatok genotípusa dpy-8 + unc-3/(SZT1)lon-2 + +, a DEO kezeltéké pedig + unc-58/(SZT1)lon-2 + volt. Az első esetben a vad típusu F₁ hermafroditákból klónokat indítottam, majd ezek utódait DPY UNC fenotípusra teszteltem. A második esetben közvetlenül a mutagenizált állatok utódait teszteltem az UNC fenotípus hiányára, mivel unc-58 egy szemidomonáns mutáció. Az ellenőrző tesztek újbóli elvégzése után 43 mutáns törzset alapítottam; 36 letális mutációt EMS-el, 7-et pedig DEO-val indukáltam, ez utóbbiak - a mutagén jellegét, valamint az izolálás módját figyelembe véve - deléciót hordozók lehetnek. A mutánsok részletes jellemzése, térképezése, komplementációs analízise folyamatban van.



EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

1. Az SZTl jellemzési adatainak értelmezése

Az SZTl az X és I. kromoszómák közötti transzlokáció eredménye. Hatásosan gátolja a rekombinációt az X kromoszóma mintegy 2/3 részén, a dpy-8 és let-2 közötti régióban (8. ábra). Feltehetően hasonló hatást fejt ki az I. kromoszóma bal végén is, ezt azonban megfelelő genetikai markerek hiányában nem tudtam részletesen megvizsgálni.

Roberts (1970) Drosophilán kapott adatokból azt a következtetést vonta le, hogy transzlokációs heterozigóták utódai között a rekombinánsok számának csökkenését nem az aneuploid szegregánsokban bekövetkezett crossover-regió elvesztése okozza, hanem az, hogy a töréspontok környezetében nem tud szinapszis kialakulni a homológ kromoszóma részek között.

Az SZTl pontos természete ismeretlen; lehet reciprok transzlokáció, vagy az X kromoszóma egy darabjának nem reciprok beépülése az I. kromoszómába, illetve ennek fordítottja. Amikor az átrendeződött kromoszóma T^1 és T^X részeire utalok, akkor T^X jelentheti az X delécióját, vagy egy I. kromoszóma darab inszercióját az X-be, vagy akár mindkettőt. A T^X és a T^1 természetesen csak együtt fordulhat elő az életképes diploid sejtben. Az eredmények alapján nyilvánvaló, hogy az életképes állatok vagy egy haploid dózist hordoznak T^1 -ből és T^X -ből, vagy egyet sem.

Elméletileg is ez az eredmény várható, hiszen más kombinációk letális duplikációt vagy deléciót jelentenének.

A citológiai vizsgálatok, főleg a kromoszómák kis mérete miatt csak az átrendeződés tényét támasztják alá, de közvetlen információt annak pontos természetéről nem szolgáltatnak. Elektronmikroszkópos felvételek több információt adhatnának, azonban ilyen preparátumok elkészítése fonalférgeken technikailag még nincs kidolgozva.

Meghatározva az SZT1 hermafroditák letális petéinek és szegregált utódainak arányát, arra lehet következtetni, hogy a kromoszómák diakinézisbeli szétválása főleg "alternate" és "adjacent-1" mintázat alapján történik, míg az "adjacent-2" szegregáció ritkább lehet.

Az SZT1 törzsben transzlokációt hordozó homozigóta állatok nem jelennek meg az utódok között. Ennek okai a következők lehetnek: (1) a törés helyén, vagy (2) ettől függetlenül bekövetkező recesszív letális mutáció; (3) a törés pozícióeffektusa. A Bal-X-1 esetében ezek közül bármelyik fennállhat. Ha azonban letális mutációról van szó, az csak a T^1 -en lehet, mivel a T^1 /normális I.; $T^X/0$ genotípusú állatok fertilis himekként jelennek meg.

2. A Bal-X-1 interkromoszómális hatása

Az SZT1 törzsből spontán kihasadó 10-15 % him csakis az X kromoszóma nondiszjunkciójával jöhetett létre. Ez az esemény 2-3 nagyságrenddel gyakoribb ebben a törzsben, mint a vad típusú állatoknál. Drosophilában is megfigyel-

ték, hogy X-autuszóma transzlokáció gyakran X-X nondisjunkcióval jár (Chandley, 1965), sőt, genetikailag kevésbé ismert fajoknál éppen ennek a jelenségnek a segítségével azonosítottak transzlokációkat (Laven, 1971).

Az 5. táblázatban látható, hogy Bal-X-1 kromoszómát hordozó állatokban a normális autoszómákon megnő a rekombinációs gyakoriság. Drosophilában megfigyelték, hogy ez a hatás heterozigótákban pozitív korrelációt mutat az intersticiális szakasz - a töréspont és a centromer közötti régió - hosszával. Rövid intersticiális szakasz, vagy homozigóta transzlokáció csökkentheti a rekombinációt (Hinton, 1965; Williamson, 1966). Meiotikus crossing-overre gyakorolt hatást leírtak más kromoszóma-átrendeződések esetén is (Lucchesi, 1976). A jelenségnek két elképzelhető magyarázata van.

Az első modell szerint (Mather, 1936; Roberts 1969) egy-egy fajta adott rekombinációs érték jellemez, ennek fenntartásáért meghatározott mennyiségű anyag (pl. enzim) felelős. Mivel a genom strukturálisan heterozigóta szegmentjeiben a rekombináció gátolt, a genom egyéb részeire a rendelkezésre álló enzimkészlet relative nagyobb hányada jut, és ez megnöveli a rekombinációt.

A másik modell Lucchesi és Suzuki (1968) nevéhez fűződik. Szerintük (a) a meiotikus profázis közben van egy olyan stádium, amikor a homológ kromoszómák párba állnak. A rekombináció ekkor játszódik le a szorosan összetapadt kromoszómák között; (b) ennek a stádiumnak akkor van vé-

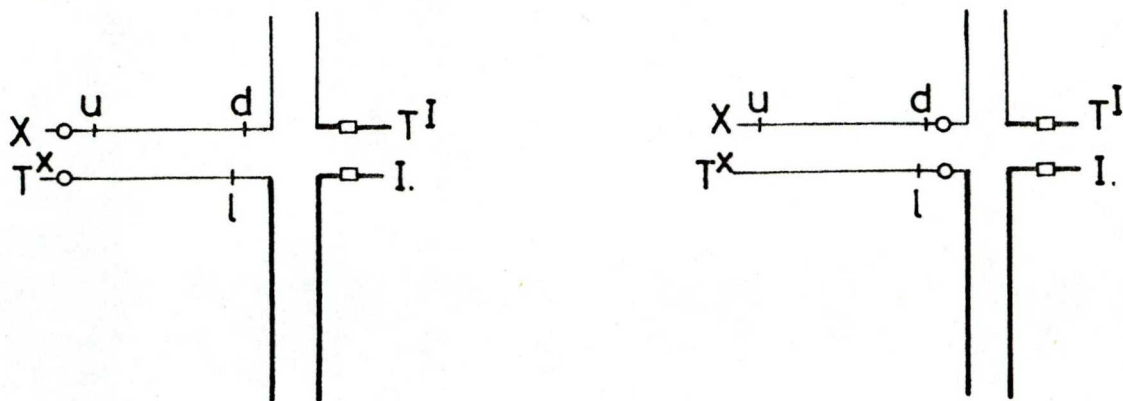
ge, mikor a genom egy bizonyos része szinaptikus állapotba jutott; (c) olyan faktorok, melyek késleltetik a kromoszómák párosodását, megnyújtják e stádium idejét is, így a már párosodott részeken több crossing-over játszódhat le.

3. Elképzelések a C. elegans kromoszómák centromerjeinek elhelyezkedésére

A C. elegans kromoszómáinak szerkezetéről, - így természetesen a centromerek jellegéről és lokalizációjáról - szerzett ismereteink hiányosak. Az eddig izolált látható mutációk a kromoszómákon nem teljesen random oszlanak meg, hanem - talán az X kromoszóma kivételével - egy-egy régióba felhalmozódva géncsoportokat alkotnak. Brenner (1974) feltételezte, hogy ezek közelében helyezkedik el a centromer. Herman (1978) korábbi kísérleteiből arra következtetett, hogy az X kromoszóma centromerje az unc-6 közelében lehet, vagyis az X metacentrikus (lásd 8. ábra). Azonban az a tény, hogy az általa ujabban izolált szabad duplikációk néhány kivételtől eltekintve az X kromoszóma jobb disztális régióját (unc-3, unc-7) tartalmazzák, arra utal, hogy a centromer legvalószínűbb helye az X kromoszómának ez a része, tehát a kromoszóma akro-, vagy telocentrikus (Herman, 1979).

Az SZT1 viselkedéséből nyert adatok alapján nem lehet pontosan megadni az X centromerjének helyét; nem cáfolható a Herman által felvetett két lehetséges centromer ré-

gió egyike sem. A 8. ábra az SZT1 heterozigóták transzlokációs kromoszómáinak pachiténbeli konfigurációját ábrázolja az X kromoszóma két feltételezett centromer-pozíciójával.



8. ábra SZT1 heterozigóták transzlokációs kromoszómáinak lehetséges pachiténbeli konfigurációja. Jelölések: O=X kromoszóma centromerje, □=I. kromoszóma centromerje, d, l, u=különböző fenotipusu marker mutációk.

További lehetőség, hogy az X kromoszóma (és feltehetően az autoszómák is) policentrikus, mint ahogy ezt a lóban elősködő Parascaris equorum nematódában találták, vagy diffúz centromerje van, amire szintén találtak már példát, mind a növény- és állatvilágban (John és Lewis, 1965). Megfelelő elektronmikroszkópos technika kidolgozása megoldhatja ezt a kérdést is.

4. Recesszív letálisok fenntartása

Az általam izolált recesszív letális mutánsok fenntartása a Bal-X-1 balanszer kromoszóma segítségével már több,

mint 50 generáción keresztül sikeres volt. Bal-X-1 kromoszómával tartjuk fenn a laboratóriumunkban meglévő, korábban duplikációkkal kiegyensúlyozott letál-mutánsokat is, mint pl. let-7(mn 110), let-2(el470), let-15(el471). Így a későbbiekben diploid állatokban tanulmányozhatjuk ezeket a géneket.

További terveink közt szerepel a Bal-X-1 által kiegyensúlyozott régió telítése recesszív letális és steril mutációkkal, ezek komplementációs analízisének és térképezésének elvégzése, és az így azonosított gének szerepének tanulmányozása. Ez kettős haszonnal járhat: (1) jelentős számú indiszpenzibilis gén funkciójára és szabályozására nézve nyerhetünk információt; (2) eldönthető lesz, hogy e gének elhelyezkedése az X kromoszómán random, vagy csoportos megoszlást mutat.

IRODALOMJEGYZÉK

1. Boveri, T. 1892.: Ueber die Entstehung des Gegensatzes zwischen den Geschlechtszellen und den somatische Zellen bei *Ascaris megalocephala*. Sitz. Ber. Ges. Morph. § Phys. München., v. 8 (2-3): 114-125, figs. 1-45.
2. Brenner, S. 1973. The genetics of behavior. Brit. Med. Bull. 29: 269-271.
3. Brenner, S. 1974. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. Genetics 77: 71-94.
4. Byerly L; Cassada R C; Russell R L. 1975. Machine for rapidly counting and measuring the size of small nematodes. Rev. Sci. Instrum. 46: 517-522.
5. Byerly L; Cassada R C; Russell R L. 1976a. The life cycle of the nematode *Caenorhabditis elegans*. Part 1: Wild type growth and reproduction. Dev. Biol. 51: 23-33.
6. Byerly L; Scherer S; Russell R L. 1976b. The life cycle of the nematode *Caenorhabditis elegans*. Part 2: A simplified method for mutant characterization. Dev. Biol. 51: 34-48.
7. Cassada R C; Russell R L. 1975. The dauer larva a post embryonic developmental variant of the nematode *Caenorhabditis elegans*. Dev. Biol. 46: 326-342.
8. Chandley A C. 1965. Application of the "distributive pairing" hypothesis to problems of segregation in translocation heterozygotes of *Drosophila melanogaster*.

Genetics 52: 247-258.

9. Chitwood B G; and Chitwood M B. 1974. Introduction to Nematology University Park Press, Baltimore.
10. Deppe U; Schierenberg E; Cole T; Krieg C; von Ehrenstein G. 1978. Cell lineages of embryo of nematode *Caenorhabditis elegans*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 75: 376-380.
11. Dougherty E C. 1949. The role of free-living nematodes in genetic research. Proc. 8th Int. Conf. Gen., Hereditas Supp.Vol. 562-564.
12. Dougherty E C. 1953. The axenic cultivation of *Rhabditis briggsae* Dougherty and Nigon, 1949 (Nematoda: Rhabditidae) III. Liver preparation with various supplementations. J. Parasitol. 39: 371-380.
13. Epstein J; Thomson J N. 1974. Temperature sensitive mutation affecting myofilament assembly in *Caenorhabditis elegans*. Nature 250: 579-580.
14. Herman R K. 1978. Crossover suppressors and balanced recessive lethals in *Caenorhabditis elegans*. Genetics, 88: 49-65.
15. Herman R K; Madl J E; Kari C K. 1979. Duplications in *Caenorhabditis elegans*. Genetics 92: 419-435.
16. Hinton C W. 1965. The effects of heterozygous autosomal translocations on recombination in the X chromosome of *Drosophila melanogaster*. Genetics 51: 971-982.
17. Hirsh D; Vanderslice R. 1976. Temperature sensitive developmental mutants of *Caenorhabditis elegans*. Dev. Biol. 49:220-235.

18. Honda H. 1925. Experimental and cytological studies on bisexual and hermaphroditic free-living nematodes with special reference to the problem of sex. J. Morph. 40: 191-233.
19. Jarvik J; Botstein D. 1975. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72: 2738-2742.
20. John B; Lewis K R. 1965. The meiotic system. Protoplasmatologia, Band VI, Fl. Springer-Verlag, Vienna and New York.
21. Laven H; Meyer E. 1971. Inherited Semisterility for Controll of Harmful Insects. II. Degree of Sterility and Types of Translocations in the Mosquito *Culex pipiens* L. Experientia 27: 471 968.
22. Lindsley D L; and Grell E H. 1968. Genetic variations of *Drosophila melanogaster*. Carnegie Inst. Washington Publ. No. 627. Washington, D,C.
23. Lucchesi J C; Suzuki D T. 1968. The interchromosomal controll of recombination. In "Annual Review of Genetics" Vol. 2. 53-86.
24. Lucchesi J C. 1976. Inter-chromosomal effects. In "The genetics and biology of *Drosophila*", Vol. 1a. 315-351.
25. Mather K. 1936. Competition between bivalents during chiasma formation. Proc. Roy. Soc. London, B120, 208-227.
26. Meenly P M; Herman R K. 1979. *Lethals*, sterils and deficiencies in a region of the X chromosome of *Caenorhabditis elegans*. Genetics, 92, 99-115.

27. Nigon V. 1949. Effects de la poliploidie chez un nematode libre. C.R. Acad. Sci. Paris 228: 1161-1162.
28. Nigon V. 1965. Development et reproduction des nematodes. In: Traite de Zoologie, Tome IV. Ed. P P Grasse.
29. Riddle D L. 1977. A genetic pathway for dauer larva formation in the nematode *Caenorhabditis elegans*. Genetics, 86: S51-S52.
30. Riddle D L. 1980. Epistatic genes in nematode development. Nature (kézirat)
31. Roberts P A. 1969. Some components of X ray-induced crossing over in females of *Drosophila melanogaster*. Genetics, 63: 387-404.
32. Roberts P A. 1970. Screening for X-ray-induced crossover suppressors in *Drosophila melanogaster*: prevalence and effectiveness of translocations. Genetics, 65: 429-448.
33. Roberts P A. 1976. The genetics of chromosome aberration. In "The genetics and biology of *Drosophila*" Vol. 1a, 68-174.
34. Schierenberg E. Die embryonalentwicklung des nematoden *Caenorhabditis elegans* als modell. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades. Göttingen, 1978.
35. Sulston J E; Brenner S. 1974. The DNA of *Caenorhabditis elegans*. Genetics, 77: 95-104.
36. Sulston J E; Dew M; Brenner S. 1976. Dopaminergic neurons in the nematoda *Caenorhabditis elegans*. Dev. Biol. 55: 215-226.

37. Sulston J E; Horvitz H R. 1977. Post embryonic cell lineages of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* 56: 110-156.
38. Suzuki D T. 1970. Temperature-sensitive mutations in *Drosophila melanogaster*. *Science*, N.Y. 170: 695-706.
39. Williamson J H. 1966. Interchromosomal effects of autosomal translocations on recombination in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 54: 1431-1440.
40. White J G; Southgate E; Thomson J N; Brenner S. 1976. The structure of the ventral nerve cord of *Caenorhabditis elegans*. *Philos. Trans.R.Soc.Lond. B. Biol. Sci.* 275: 327-342.

