B 1859

MTA Szegedi Biológiai Központ
Genetikai Intézet
Rovargenetikai Csoport

Ivari kromoszómán lokalizált gének különböző hőérzékeny letális alléljeinek összehasonlító vizsgálata Drosophila melanogasteren

Tábith Klára

Szeged, 1978.

T A R T A L O M J E G Y Z É K

oldal

Rövidítések jegyzéke 3

Bevezetés 5

1. Irodalmi áttekintés 9

1.1. A hőérzékeny mutánsok 9

1.1.1. A hőérzékeny mutánsok általános felhasználása 9

1.1.2. A hőérzékeny mutációk molekuláris mechanizmusa 11

1.1.3. Eukarióta hőérzékeny mutánsok sajátságai. 13

1.1.4. Hőérzékeny mutációk Drosophilában 16

1.2. A Drosophila melanogaster mint fejlődésgenetikai objektum 17

1.2.1. A Drosophila melanogaster egyedfejlődése. 17

1.2.2. A determináció fogalma; duplikáció, regeneráció 21

2. Anyag és módszer 24

2.1. Mutagenezis és a mutánsok izolálása 24

2.2. Komplementációs analizis 26

2.3. A mutációk autonómiájának vizsgálata 28

2.4. A mutációk térképhelyzetének meghatározása. 30

2.5. A mutációk időbeli fókuszálása 31

2.5.1. A letál-periódus és a fejlődési ciklus meghatározása 31

2.5.2. Hő-shift kisérletek 33

2.5.3. Hőpulzus kisérletek 34

József Attila Tudományegyetem Könyvtára SZEGED

oldal

2.5.3.1. A hőpulzus elvégzése 34

2.5.3.2. Az imágó korongok sejthalál-mintázatának vizsgálata 36

3. Eredmények 38

3.1. A mutánsok izolálásának és komplementációs analizisének eredménye 38

3.2. A sejt-autonómia meghatározása 38

3.3. A mutációk térképhelyzete 39

3.4. A mutánsok letál- és hőérzékeny periódusa . 40

3.4.1. A letál-periódus meghatározásának eredménye 40

3.4.2. A vizsgált törzsek fejlődési ciklusa 43

3.4.3. Termoszenzitiv periódus 44

3.5. A hőpulzus kisérletek eredményei 45

3.5.1. Morfológiai rendellenességek 45

3.5.2. A hőpulzusok hatása az imágó korongokra . 47

4. Eredményeink megvitatása 48

4.1. A letál-periódus és az azonos komplementációs csoportba tartozó mutánsok letál-periódusának összehasonlitása 48

4.2. Az egy komplementációs csoportba tartozó mutánsok termoszenzitiv-periódusának összehasonlitása 52

4.3. Az imágó korongok sejthalál-mintázata és a megfelelő adult szervek rendellenessége közötti összefüggés 57

Összefoglalás 67

Függelék

Irodalomjegyzék

R Ö V I D I T É S E K J E G Y Z É K E

A jelöléseket ld. Lindsley és Grell /1968/

B: rés alaku szem /1-57.0/

B^{M1}: inverziót tartalmazó balanszer kromoszóma, In/1/16A2-5; 20A3-B

Binsn: többszörös inverziót tartalmazó balanszer kromoszóma, mely a dominánsB gyenge alléljá t és recessziv sn szőrmutációt hordoz

car: sötét rubin szinü szem /1-62.5/

ClB: nagy inverziót tartalmazó balanszer kromoszóma B és recessziv letális mutációkkal jelölve

cm: karmin szemszin /1-18.9/

ct^6: metszett szárnyvégek /1-20.0/

cv: szárny keresztvénák hiányoznak /1-13.7/

dl49: inverziót tartalmazó balanszer kromoszóma In/1/4D7-E1; 11F2-4

f9 villás szőr /1-56.7/

LP: letál-periódus

l^{ts}: recessziv hőérzékeny letális mutáció

mal: barnás bibor szemszin /1-64.8/

mal^3: deficiencia, mely magába foglalja a mal mutációt

mal^6: deficiencia, mely magába foglalja a mal mutációt Df/1/19C1-2; 20A3-4

oc: ocellusok teljesen hiányoznak /1-23.1/

Oregon R: vad laboratóriumi törzs

R: gyűrűvé zárt X kromoszóma, mely a sejtmagosztódás során gyakran eliminálódik

sc^{8}: inverziót tartalmazó balanszer kromoszóma In/1/1B2-3; 20B-D1

sn: perzselt szőr /1-21.0/

sn^{x2}: röntgen sugárzással nyert sn allél, homozigóta ♀ steril

su-f: f mutációkat szupresszálja /1-61.9/

$su\text{-}f^{5A}$: deficiencia a su-f mutáció területén Df/1/20A3-4; 20F

$su\text{-}f^{ts}$: su-f hőérzékeny allélja

ts: termoszenzitiv, hőérzékeny

TSP: termoszenzitiv-periódus, hőérzékeny szakasz

v: tündöklő skarlát szinü szem, ocellusok szintelenek /1-33.0/

w: fehér szem, ocellusok szintelenek /1-1.5/

xx: két X kromoszóma proximálisan kapcsolt egy centromerához

y: sárga testszin, szőrök sárga végü barnák /1-0.0/

B E V E Z E T É S

Az egyedfejlődés differenciált génaktivitás eredménye. Minden fejlődésgenetikai kutatás legfőbb célja ennek a genetikai programnak, az egyedfejlődés genetikai szabályozása általános törvényszerüségeinek a feltárása.

Ha egy gén, vagy a terméke az egyedfejlődés egy adott szakaszában alapvető szerepet játszik, akkor müködésének hiánya letalitást eredményez a kérdéses fejlődési szakaszban. A letalitás tehát egy végeredmény, ezért a génmüködésről, illetve az esetek többségében a géntermék felhasználásának időbeliségéről e létfontosságu gének kondicionált letális mutánsainak tanulmányozása révén szerezhetünk tudomást. A kondicionált mutánsokra az jellemző, hogy fenotipusuk csak bizonyos /restriktiv, gátló/ környezeti feltételek között érvényesül, mig a megengedő /permissziv/ körülmények között a vad fenotipus nyilvánul meg. Ha a fenotipus a letalitás, akkor restriktiv körülmények között a kondicionált letális mutációt hordozó egyed recesszív mutáció esetén homo-, illetve hemizigóta formában, domináns mutáció esetén ezeken tul heterozigóta formában is elpusztul. A recesszív kondicionált letálisok egyik

- eukarióta rendszerekben leggyakoribb - tipusát a recesszív hőérzékeny /termoszenzitiv, a továbbiakban: ts/ letálisok képviselik.

Hőérzékeny letális mutánsok felhasználásával számos általános genetikai és molekulár-biológiai problémát tisztáztak, és további kérdések megoldása várható. Számos speciálisan eukarióta probléma is megközelitható felhasználásukkal; igy a kromoszómaszerkezet és müködés, az idegmüködés és magatartás, az izomfehérjék genetikai meghatározottsága és - számunkra elsődleges fontossággal - a differenciálódás és az egyedfejlődés genetikai szabályozása.

Ez utóbbi probléma tanulmányozására különösen alkalmas rendszerek a sejt-letális hőérzékeny Drosophila mutánsok imágó korongjai. Az imágó korongok a teljes átalakulással fejlődő rovarok felnőtt epidermális strukturáinak lárválís kezdeményei. A kondicionált sejt-letális mutáció lehetővé teszi, hogy rövid idejü restriktiv hatásra az imágó korongokban fellépő sejtpusztulást és annak következményeit az adult szervekben vizsgáljuk.

A Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Központja Genetikai Intézetében a Rovargenetikai Csoport egyik kutatási témája a fejlődésben hibás ivari /X/ kromoszómás letál-mutánsok tanulmányozása.

Ennek során számos hőérzékeny mutáns izolálására került sor. A legutóbb izolált mintegy 50 X kromoszómás recessziv ts letális mutáns komplementációs analizise során azt találtuk, hogy két lókuszhoz egynél több /két-két/ mutáns tartozik.

Dolgozatom témája e mutánsok összehasonlitó jellemzése. E célból a következő kisérleteket végeztük el: gynander teszttel megvizsgáltuk, hogy a mutációk autonóm módon nyilvánulnak-e meg; meghatároztuk a mutáns gének térképhelyzetét; meghatároztuk a mutánsok és az azonos gén különböző alléljeire heterozigóta állatok hőérzékeny- és letál-periódusát. Ezt követően vizsgáltuk az imágó korongokban hőpulzussal előidézhető sejt-halál mintázat és az imágók megfelelő szerveinek torzulásai /deficienciák, duplikációk/ közötti összefüggést. Mindkét gén esetében összehasonlitottuk az egyes allélekre /a_1, a_2/ homozigóta (a_1/a_1) és az azokra heterozigóta (a_1/a_2) egyedekkel kapcsolatos eredményeket.

Ha figyelembe vesszük a Drosophila genomban működő gének valószinü számát (5000) /Judd és mtsai, 1972; Fristrom és Yund, 1973/ és közülük az imágókorongok fejlődéséért felelősek becsült számát (1000) /Shearn és Garen, 1974/, nem várhatjuk, hogy néhány X kromoszómás mutáns jellemzésével a fejlődésgenetika

vázolt nagy problémáit megoldhatjuk. Irodalmi ismereteink alapján azonban ugy tünik, hogy jelenleg e tudományterület számára ujabb és ujabb mutánsok megismerése hasznos lehet.

József Attila Tudományegyetem Könyvtára SZEGED

1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1.1. A HŐÉRZÉKENY MUTÁNSOK

1.1.1. A hőérzékeny mutánsok általános felhasználása

Régóta ismert, hogy a hőmérséklet egyes állatoknál befolyásolja a külső megjelenést. A század elején több rovar és gerinces esetében figyelték meg e hatást /összefoglalva ld. Suzuki és mtsai, 1973/. Az első hőérzékeny Drosophila mutánst Hoge /1915/ irta le. Ő ismerte fel azt is, hogy a termoszenzitiv-periódus /továbbiakban: TSP/ hő-shift kisérletekkel meghatározható.

A hőérzékeny mutánsok valódi jelentőségére akkor derült fény, amikor elvi problémát sikerült segitségükkel megoldani. Igy - az akkor már nagymértékben valószinüsitett - egy gén-egy enzim elmélet perdöntő bizonyitékát, az indiszpenzibilis gének ts alléljeinek előállitása szolgálta /Horowitz és Leupold, 1951/. Első "fejlődésgenetikai" felhasználásuk dohánymozaik viruson végzett munkák során történt. E kisérletekkel vált ismertté, hogy a különböző virusrészecskék szintézisét más és más szabályos sorrendben müködésbe lépő gének

determinálják, mig összekapcsolódásuk spontán folyamat /Fraenkel-Conrat és Williams, 1955/.

Vizsgálták egy viszonylag bonyolultabb "szervezet", a T4 fág fejlődését is, mely "korai" és "késői" gének szekventált működésének eredménye /Epstein és mtsai, 1963/. Ez a mechanizmus bakteriofágokban általános érvényü, igy igaz a Rhizobium meliloti 16-3 fágjára is /Orosz, 1972/.

Számos anyagcsere utat tisztáztak ts auxotrófok, illetve valamely terméket bontani nem tudó ts-hiánymutánsok felhasználásával, E. coliban /Nishimara és mtsai, 1964/, gombákban /Horowitz és Fling, 1953; Stent, 1971/. Amennyiben a sporulációt egy primitiv fejlődési folyamatnak tekintjük, ugy fejlődésgenetikai felhasználásnak tekinthetjük az élesztőkön /Evans és Parry, 1974/ ts mutánsokkal végzett munkákat is /Eposito és Eposito, 1969/.

A mikrobákon végzett sikeres munkák felkeltették a hőérzékeny mutánsok iránt az érdeklődést az eukariótákkal foglalkozó kutatók körében is - különösen a ts mutációk molekuláris mechanizmusának megismerése után. Izoláltak ts mutánsokat egysejtüek közül Parameciumban /Igrashi, 1966/, növényeknél buzában /Schwartz, 1958/, Arabidopsisban /Langridge, 1965/; állatok közül Muscában /McDonald és Overland,

1972/, Drosophilában /Suzuki és mtsai, 1967, 1968, 1974; Russel, 1974; Arking, 1975/, és ujabban Nematodák közül Caenorhabditis elegansban /Cassada, 1972; Hirsch és Vanderslice, 1976/.

1.1.2. A hőérzékeny mutációk molekuláris mechanizmusa

A hőérzékenység molekuláris mechanizmusát mikroorganizmusokon vizsgálták. Ts letális T4 fággal végzett kisérletek során kiderült, hogy a ts fenotipust missense tipusu pontmutációk okozzák /Edgar és mtsai, 1964 a., b./. Ts dohánymozaik virus burokfehérje negyedleges szerkezetének alakulását vizsgálva a környezeti feltételek függvényében - pH, hőmérséklet - megállapitották /Jockusch, 1966/, hogy a missense mutációknak két tipusa van /Jockusch,1966/:

1./ A fehérjemolekula konformációját megtartja, de funkcióját elveszíti.

2./ A fehérjemolekula konformációja az aminosavcsere következtében megváltozik, s egyidejüleg a funkció hőlabilis lesz. Ha a konformáció-változás hőmérsékletfüggő, ugy elképzelhető, hogy a tercier és a quaterner struktura egy hőtartományban lehetővé teszi, egy másikban pedig nem az enzim normális müködését. A missense mutáció tehát megváltoztatja

az enzim hőoptimumát. Mivel a géntermék nincs teljesen "elrontva", ezért "leaky" lehet a ts mutáció, azaz penetranciája nem feltétlenül 100%-os.

Felmerül a kérdés, hogy vajon a hőérzékeny Drosophila mutánsokban is missense tipusu pontmutáció okozza-e a fenotipust. Noha a Drosophila ts mutánsok sajátságai sok tekintetben hasonlónak tünnek a missense mutánsokéval - pl. jól türi a magas sókoncentrációt, akárcsak az élesztő missense mutáns /Suzuki, 1970/, mégsem lehet egyértelmü igennel válaszolni. Fristrom /1970/ ugy véli, hogy a kémiailag indukált ts mutánsok egy része kis deléció következménye. Azt is kimutatták /Kaufmann és Suzuki, 1974/, hogy a γ-sugár indukálta ts-k részben transzlokációk. Ismeretes továbbá egy rosy ts mutáns, melyben Xantindehidrogenázt kimutatni nem sikerült /Schwink, 1961/. Ugyanakkor azonban azt, hogy missense mutáció következtében jelentkezik a hőlabilitás Drosophilában is, több tény támasztja alá. Igy pl. számos termolabilis enzimet izoláltak ts mutánsokból; valamint a különböző ts-t indukáló mutagének /EMS, mitomycin C, nitrosoguanidin, γ-sugárzás/ közül az EMS a leghatékonyabb /Suzuki és mtsai, 1967; Judd és mtsai, 1972/. Az EMS u.i. elsősorban missense mutációkat indukál: G-C bázispárt

A-T-vé alakitja /Krieg, 1963/. Ugyanakkor a frameshift mutációt okozó akridin-származékok nem indukálnak ts mutációkat /Carlson és mtsai, 1967/.

1.1.3. Eukarióta hőérzékeny mutánsok sajátságai

Az eukarióta hőérzékeny mutánsok jellemezhetőek letál-periódusukkal /továbbiakban:LP/ és hőérzékeny szakaszukkal /termoszenzitiv-periódus, továbbiakban: TSP/ /Hoge, 1915/. A LP a Drosophila esetében azt a fejlődési stádiumot jelöli, amelyben a halál bekövetkezik restriktiv körülmények között. A LP egészen a frissen kikelt adultig elhuzódhat /Suzuki, 1970/. A restriktiv hőmérséklet - a szelekciós körülményektől függően - a Drosophila ts mutánsok esetén 29°C, mig a permissziv hőmérséklet - a ts mutánsok zöménél - 22°C, a 17°C pedig minden esetben az.

A LP csak a restriktiv körülmények végeredményét jelzi, a tényleges hőérzékeny szakaszról a TSP meghatározása ad felvilágositást. A TSP jelentheti a kérdéses gén ontogenetikus aktivitásának idejét, valószinübb azonban, hogy a géntermék felhasználásának szakaszát jelzi /Tarasoff és Suzuki, 1970/. Magasabbrendüekben ui. kimutattak hosszu életü

m-RNS-t /Collier, 1966; Spirin, 1966/, és inaktiv polipeptidet is /Neurath, 1957/. Ugyanakkor azonban soksejtüekben azt is kimutatták, hogy számos olyan fehérje is szintetizálódik a fejlődés alatt, amely rögtön felhasználódik /Hotta és Stern, 1963/. Ezek alapján a TSP feltehetőleg azt az időszakaszt és fejlődési stádiumot jelöli, amelyben a kérdéses géntermék képződik, vagy olyan konformációváltozáson megy keresztül, mely a biológiai aktivitáshoz szükséges; elképzelhető az is, hogy az elsődleges géntermék aktuális aktivitásának szakasza /Tarasoff és Suzuki, 1970/.

TSP-t a Drosophila fejlődésének valamennyi stádiumában feljegyeztek a különböző mutánsok esetében /Suzuki és mtsai, 1973/. A TSP hossza mutánsonként változó, s néhány órától néhány napig terjedhet, több fejlődési stádiumon is keresztül huzódhat. Ennek megfelelően a TSP monofázikus vagy polifázikus /Suzuki és mtsai, 1973/ aszerint, hogy egy vagy több fejlődési stádiumot fed át. Az elhuzódó TSP magyarázatára több hipotézist is leirtak /Tarasoff és Suzuki, 1970/. Elképzelhető, hogy folyamatos a génmüködés és a transzkripció vagy a transzláció valamely lépése hőérzékeny. Másik lehetőség, hogy a fejlődés során a géntermék iránt állandó igény van.

Az is feltételezhető, hogy valamilyen létfontosságu strukturelem a hőérzékeny. E lehetőségek között csak akkor tudnánk dönteni, ha a génterméket ismernénk. Drosophilában azonban csak viszonylag kevés gén termékéről tudjuk ezt elmondani /Dickinson és Sullivan, 1975; Fox és mtsai, 1971/.

A TSP lehet folyamatos és megszakitott /Suzuki és mtsai, 1973/. A többszörös TSP magyarázatául a következőket adták /Tarasoff és Suzuki, 1970/. Elképzelhető, hogy a különböző szervek, szövetek sejtjeiben a gén különböző időpontokban aktiválódik. Másik magyarázat lehet, hogy egy gén többször aktiválódik. Az is feltételezhető, hogy egy termolabilis géntermék egyszer szintetizálódik, de több izben kerül felhasználásra; a TSP pedig a felhasználás idejét jelzi.

A LP nem szükségszerüen egyezik a TSP-vel. A két periódus között lehetséges átfedés, de általában a TSP megelőzi a LP-t. A TSP és LP között eltelt idő jellemző az illető mutánsra; néhány órától néhány napig terjedhet /Suzuki és Duck, 1967; Tarasoff és Suzuki, 1970; Russel, 1974/.

A TSP és a térképhelyzet között nincs korreláció /Tarasoff és Suzuki, 1970/.

Mivel a TSP a mutáció hatásának időbeli - ezen

keresztül fejlődési stádiumhoz rendelt - fókuszálását jelenti, lehetővé teszi az eukarióta ts mutánsok felhasználását fejlődésbiológiai tanulmányokban.

1.1.4. Hőérzékeny mutációk Drosophilában

Az eddig ismert hőérzékeny mutációk fajtái Drosophilában a következők:
Termoszenzitiv recessziv, X kromoszómás /Suzuki és mtsai, 1967; Suzuki, 1970; Tarasoff és Suzuki , 1970; Russel, 1974; Arking, 1973, 1975/.
Termoszenzitiv recessziv, autoszomás /Baillie és mtsai, 1968/.
Termoszenzitiv domináns /DTS/, autoszomás /Suzuki és Procunier, 1968; Suzuki, 1970; Holden és Suzuki, 1973/.
Hidegszenzitiv recessziv /CS/, X kromoszómás /Wright, 1974/.
Hidegszenzitiv domináns /DCS/, autoszomás /Rosenbluth és mtsai, 1972/.
Termoszenzitiv paralitikus mutánsok /Grigliatti és mtsai, 1972; Poodry és mtsai, 1973; Suzuki, 1974; Hall, 1974/.
Y kromoszómás termoszenzitiv /Ayles és mtsai, 1973; Sanders és Ayles, 1970/.

Termoszenzitiv homeotikus mutánsok /Grigliatti, és Suzuki, 1971/.
Hősokk érzékeny mutánsok, autoszomás /3. kromoszóma/ /Gausz és mtsai, nem közölt adatok, 1976/.

1.2. A DROSOPHILA MELANOGASTER MINT FEJLŐDÉSGENETIKAI OBJEKTUM

1.2.1. A Drosophila melanogaster egyedfejlődése

A Drosophila melanogaster Meigen-t fejlődésgenetikai felhasználásra alkalmassá teszi az, hogy a Holometabola, vagyis a teljes átalakulással fejlődő rovarok csoportjába tartozik.

A zigóta sejtmagja 9 szinkron osztódáson megy át. Ezt követően az ekkor még totipotens sejtmagok radiális irányban, egymás utját nem keresztezve a felszinre vándorolnak, ahol további 3 sejtosztódás következik be. Igy a blasztodermát 2^{12} sejtmag, majd a közöttük kialakuló sejtmembránok révén ugyanilyen számu /gyakorlatilag 3 200 - 3 500/ sejt jelenti. Mindez néhány óra alatt zajlik le /Sonnenblick, 1950/. Ez ideig az életfunkciókat az anyai gének által meghatározott citoplazma látja el. Ezt követően indul meg a sejtfunkciókhoz szükséges gének működése.

József Attila Tudományegyetem Könyvtára SZEGED

A további petén belüli differenciáció során az utódsejtek egy lárválís és egy imaginális készletre válnak szét /Poulson, 1950/. A blasztoderma felszinének kb. 15-20 %-a felel meg az imaginális szervkezdeményeknek /Fristrom és Yund, 1973/. Embriológiailag ezután a grasztruláció, majd a szelvényezettség figyelhető meg.

A tojásból az első stádiumos lárva kel ki /25°C-on 24 órán belül/, majd növekedése során két további vedlés történik, miközben második, illetve harmadik stádiumos lárva lesz. A különböző fejlődési stádiumu lárvákat nagyságuk, precizebben a szájszerveikben levő fogazat alapján tudjuk elkülöniteni /Bodenstein, 1950/. A lárvák lárválís szöveteket /melyek politének/ és az adult szövetek kezdeményeit, az imaginális sejteket /melyek diploidok/ tartalmazzák. Az imaginális sejtek vagy laza csoportot alkotnak, mint pl. az abdominális hisztoblasztok, vagy pedig korongokhoz hasonló strukturákká, un. imágó korongokká állnak össze.

Az imágó korongok áttetsző, 40-200 µ átmérőjü, egyszerü felépitésü szervek. Az adult légy különböző testrészeit különböző korongok reprezentálják. Igy megkülönböztetjük a szem és antenna, szárny, billér, 3 pár láb, szájszervek, valamint a genitáliák imágó

korongjait.

Az imágó korongok morfogenezisével kapcsolatban a következő jelenségek lényegesek; /Nöthiger, 1972/:

a./ a sejtek vagy szövetek aktiv migrációja vagy passziv mozgása

b./ a mitotikus orsó orientációja

c./ helyi különbségek a mitotikus aktivitásban

d./ helyi különbségek a sejtek nagyságában és alakjában

e./ lokalizált sejthalál.

Különböző szárny és szem mutánsok vizsgálata /Fristrom, 1969, 1972 b.; Spreij, 1971/ azt mutatta, hogy az adult szerv sajátos alakja összefügg az imágó korongok specifikus régiójában jelentkező sejthalállal. Spreij /1971/ azt találta, hogy a sejthalál térbeli és időbeli mintázatot mutat a különböző korongokban. Ezek alapján feltételezte, hogy a sejthalál-mintázatnak morfogenetikai jelentősége van az imágó korongok fejlődésében. Az elpusztult sejtek először a II. lárva vedlés után mutathatók ki megfelelő festéssel /Spreij, 1971/. A III. stádiumban később kialakul a degenerálódott sejtek térbeli mintája.

A III. lárva stádiumot a báb állapot követi. A bábban a hormonális környezet megváltozására

/részletesebben ld. lent/ jelentős változások mennek végbe: a lárvális szervek nagy része hisztolizálódik, kivéve a Malpighi-edényeket és a központi idegrendszert, mig az imaginális szervkezdeményekből az adult test alakul ki /Bodenstein, 1950/.

A fejlődés e szakaszában történik az imágó korongok un. evaginációja, melynek során azok kesztyüujjszerüen kitüremkednek, s megközelitőleg felveszik a felnőtt szerv alakját. Az evaginácio a bábozódás alatt: a pupáriumképzés és a pupális vedlés között eltelő 12 órában zajlik le.

Az előbbiekben ismertetett fejlődés endokrin szabályozás alatt megy végbe, melynek lényege, hogy a juvenil-hormon a lárvális növekedést, az ekdizon a vedlést biztositja. Az előbbi a Dipterák gyürü mirigyének mediális részén termelődik, mely megfelel más rovaroknál a corpus allatumnak, mig az ekdizont a gyürü mirigy nagy laterális sejtjei termelik. /Vogt, 1943/. A vedlési hormon jelenléte szükséges az imágó korongok evaginációjához in vivo és in vitro /Robb, 1969; Fristrom és mtsai, 1973/.

Borst és mtsai /1974/ megmérték a β-ekdizon mennyiségének változását in vivo. Azt találták, hogy a III. stádiumos lárvában a hormonszint alacsony, majd a lárva stádium végén az ekdizon mennyisége

hirtelen megháromszorozódik; a bábban tovább nő, az imágóban azonban ismét lecsökken a III. stádiumos lárvában talált szintre. /Maróy, szóbeli közlés/.

A III. lárva stádium idején az imaginális szervkezdemények /17 imágó korong, abdominális hisztoblasztok, a bél és Malpighi-edények egy szakasza, az idegrendszer egy része /ekdizon-kompetensek lesznek. A lárva állapotot követő vedlés után a juvenil hormon termelés megszünik, mig az ekdizon mennyisége tovább növekedik /ld. fent/. Ennek következtében a két hormon egyensulya az ekdizon javára dől el, s ez kiváltja az imágó korongok adult strukturákká való differenciálódását.

1.2.2. A determináció fogalma; duplikáció, regeneráció

Azt a folyamatot, melynek eredményeként a sejt vagy sejtcsoport lehetséges fejlődési utjainak száma fokozatosan csökken, determinációnak nevezzük. Az egyes sejtek determinált állapotának meghatározására a következő kritériumok szolgálnak /Gehring és Nöthiger, 1973/:

1./ A sejt izoláltan vagy más sejtektől körülvéve is képes autonóm módon differenciálódni.

2./ Különböző sejtek keverékében a sejt

asszociálódik az azonos hisztotipusu sejtekkel és szegregálódik az eltérő hisztotipusuaktól.

3./ Egy determinált sejt utódai az anyasejthez hasonló determináltságuak.

A Drosophila imaginális diszkuszai nagyon alkalmasak a determináció tanulmányozására. Az adult strukturák determinációja a blasztoderma állapotban következik be: a sejtek blasztoderma felszinén elfoglalt helyzete határozza meg, hogy mely szerv vagy szövet premordiuma /Chan és Gehring, 1971/.

Az imágó korongok különböző részeinek fejlődési képességét a korongok mechanikus sértésével vagy darabolásával vizsgálták /Bryant, 1971; Schubiger, 1971; Szabad, szóbeli közlés/. Egy bizonyos terület sértésével el lehetett érni, hogy a kialakult kutikulán a sértett területnek megfelelő struktura hiányozzon. Ha a korongok darabjait lárvába transzplantálták, akkor a fragmentumból kialakultak azok a strukturák, amelyre az "be volt programozva" /Bodenstein, 1941/. E vizsgálatok kimutatták a korongok mozaikos determináltságát, azaz a korongok egyes részeiből az adult struktura meghatározott része fejlődik. Ez a sejtszintig is követhető meghatározottság lehetővé tette, hogy az egyes korongokban feltérképezték a strukturák kezdeményeinek elhelyezkedését.

Igy elkészitették egyes korongok un. "sorstérképét" /részletesebben ld. Garcia-Bellido, 1972/.

Az imágó korongok mechanikus sértését több fejlődési ut /regeneráció vagy duplikáció vagy transzdetermináció/ követheti /Bryant, 1974/. E folyamatok részletesen még ma sem ismertek. Magyarázatukra két hipotézis is szolgál. Az egyik szerint a differenciálatlanul maradt "ős-sejtek" osztódnak, majd ezek determinálódnak; a másik lehetőség, hogy a sejtek dedifferenciálódnak, majd az osztódást követően redifferenciálódnak /redeterminálódnak/.

2. ANYAG ÉS MÓDSZER

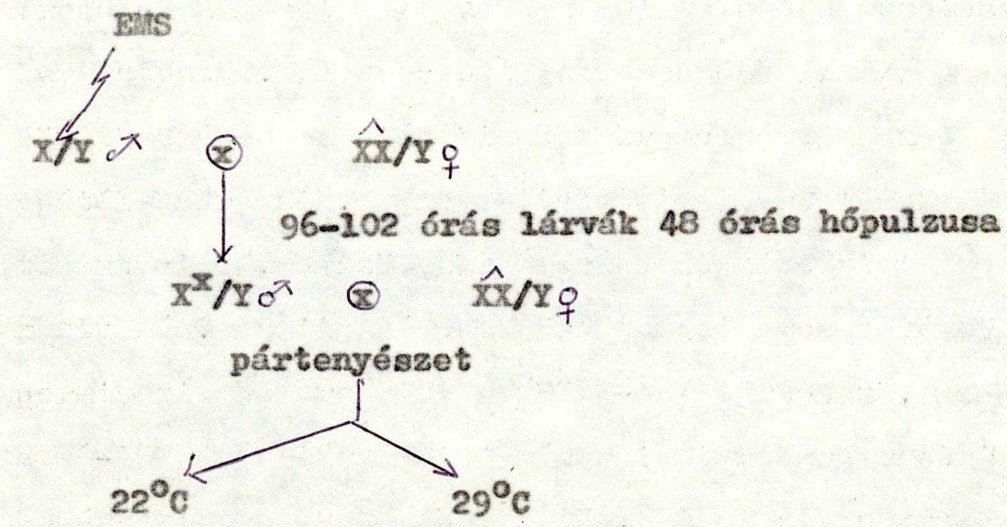
2.1. MUTAGENEZIS ÉS A MUTÁNSOK IZOLÁLÁSA

A mutációkat 0,025M-os etil-metán-szulfonát /EMS/ oldattal indukáltuk Lewis és Bacher /1968/ módszerével.

A mutánsokat az általában használt ClB-módszer /Müller, 1954/ helyett egy uj, céljainknak jobban megfelelő módon szelektáltuk, mely azon alapul, hogy a ts mutánsoknál a restriktiv hőpulzus a fejlődést lassitja vagy leállitja. Az EMS-sel kezelt Oregon-R himeket $\hat{X}X/Y$ nősténnyel tömegtenyészetben kereszteztük. /A kapcsolt X kromoszóma $//\hat{X}X//$ következtében az utód himek X kromoszómája az apától származik, mely feltehetőleg tartalmazza a ts mutációt/. A szülőket 6 óránként uj táptalajra ráztuk át. Az ily módon gyüjtött szinkron petéket permissziv hőmérsékleten /22°C-on/ tartottuk, majd a 96-102 órás lárvákat 48 órás időtartamra restriktiv hőmérsékletre /29°C/ helyeztük. Mivel számunkra azok a mutánsok érdekesek, melyek III. stádiumos lárváinak fejlődése restriktiv körülmények között lelassul vagy leáll, igy a kikelő himek közül azokat tesztel-tük, melyek a vad tipusu lárvák fejlődési idején

/22°C-on 12-14 nap/ tul keltek ki, ezek közül is elsőként a legkésőbb kelteket, mivel a ts fenotipus ezeknél érvényesült a legintenzivebben. Az ily módon szelektált himeket teszteltük, hogy X kromoszómájuk valóban hordoz-e ts mutációt: $\hat{XX}/Y$ nőstényekkel pártenyészetbe vittük őket, s először permissziv hőmérsékleten /kontroll/, majd pedig restriktiven petéztettük, s figyeltük, hogy e keresztezésekből 29°C-on kelnek-e him utódok. Ezek hiánya ts letális mutáció jelenlétére utal.

Keresztezési sémánk a fentieket összefoglalva a következő volt:



X^x/Y ♂	:	$\hat{XX}/Y$ ♀	X^x/Y ♂	:	$\hat{XX}/Y$ ♀	
1	:	1	1	:	1	- X kromoszóma nem hordoz ts mutációt
			∅	:	1	- X kromoszómán ts mutáció van

A fenti módon a mutációt hemizigóta formában hordozó legyeket izoláltunk, a további munka azonban a mutációra homozigóta állatokat igényel. Ezeket a következő keresztezéssel nyertük:

$$\frac{\text{ClB}}{\text{Binsn}}\,♀ \;\otimes\; \frac{\text{ts}}{\text{ts}}\,♂$$

$$\frac{\text{Binsn}}{\text{ts}}\,♀ \;\otimes\; \frac{\text{ts}}{\text{ts}}\,♂$$

$$\frac{\text{ts}}{\text{ts}} \quad \text{törzs}$$

/A jelöléseket ld. 1. oldalon./

Az igy előállitott homozigóta és fertilis törzseket ujra teszteltük, s a további vizsgálatokhoz csak a stabilan ts, jó fertilitásu törzseket használtuk.

2.2. KOMPLEMENTÁCIÓS ANALIZIS

Az izolált 50 ts törzs komplementációs viszonyait állapitottuk meg elsőként, mellyel meghatároztuk, hogy mutánsaink hány cisztront képviselnek. A szükséges keresztezéseket az alábbi módon végeztük:

P: $\frac{ts1}{ts1}\,♀$ ⊗ $\frac{ts2}{}\,♂$

F_1: $\frac{ts1}{ts2}\,♀$ - komplementáció esetén kikelnek 29°C-on, de letális, ha a két mutáció egy ciszt ronban van

$\frac{ts1}{}\,♂$ - letális 29°C-on

Minden keresztezésből legalább 5 pártenyészetet inditottunk. Az anyai hatás eldöntésére a reciprok keresztezéseket is elvégeztük.

A szülőpárokat 3 napig 22°C-on petéztettük, s restriktiv körülmények közé /29°C/ kerültek ujabb 3 napig. Igy azonos szülőpártól származtak a 22°C-os kontroll és a 29°C-os - komplementáció esetén kikelő - utódok.

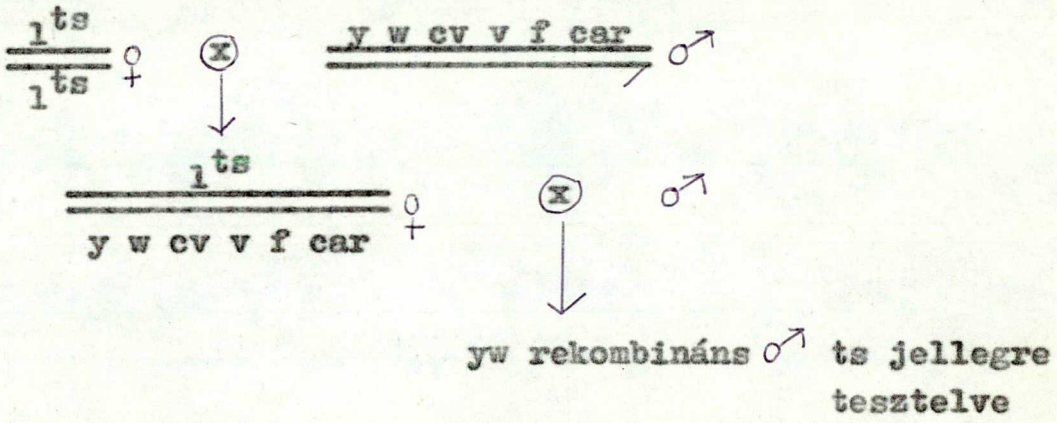
A komplementációs vizsgálatok során 2-2, páronként nem komplementáló mutánst találtunk, melyek az 1029. és 157., valamint a 844. és 451. izolálási számot viselik. Dolgozatom a továbbiakban e mutánsok jellemzésére szoritkozik.

2.3. A MUTÁCIÓK AUTONÓMIÁJÁNAK VIZSGÁLATA

Annak eldöntésére, hogy a mutációk autonóm módon nyilvánulnak-e meg a sejtekben, több módszer szolgál. Ezek közül a gynander teszt /Hinton, 1955/ a legkönnyebben kivitelezhető. Ennek lényege, hogy egy gyürüvé záródott ring X /R/ kromoszóma bevitelével genetikai mozaikokat válthatunk ki, ui. az első sejtmagosztódás során a R kromoszóma gyakran eliminálódik, s ennek következtében a mutációt hordozó X kromoszómára hemizigótává válnak az utódsejtek. Az ily módon keletkező klón határvonalának lefutása véletlenszerü az állat testén.

Ha e vizsgálatot ts letális mutánsokkal végezzük, akkor azon esetben, mikor a hemizigóta klónok elpusztulnak retriktiv hőmérséklen, a mutáció autonóm módon nyilvánul meg a sejtekben; ha viszont ezek tulélnek, akkor nem autonóm módon.

Ahhoz, hogy ezek a foltok elkülönithetőek legyenek, recessziv markerekkel kellett jelölni a mutációt hordozó kromoszómát. Erre a célra a y testszint és a w szemszint használtuk.



/Jelöléseket ld. 1. oldalon./

Az RY♂-ket olyan ywl^{ts} heterozigóta ♀-kel célszerü keresztezni, amelyek másik X kromoszómája is jelölt, igy ui. a keresztezésből származó mindkét genotipusu ♀utód hemizigóta foltjait jól elkülönithetjük a vad tipusu, R kromoszómát tartalmazó sejtekből felépülő testrészektől. Ily módon egyidejüleg kisérletünk kontrollját is elvégezzük.

P: $\frac{ywl^{ts}}{Binsn}$ ♀ ⊗ $\frac{R}{}$ ♂

F_1 genotipus: $\frac{ywl^{ts}}{/R/}$ ♀, $\frac{Binsn}{/R/}$ ♀, $\frac{ywl^{ts}}{}$ ♂, $\frac{Binsn}{}$ ♂

fenotipus: /+/ /B/

hemizigóta folt

fenotipusa 22°C-on: yw B, sn

29°C-on: - B, sn

A kisérlet kiértékelése a különböző fenotipusu legyek s a nőstények között a mozaikosok megszámlálásából állt.

2.4. A MUTÁCIÓK TÉRKÉPHELYZETÉNEK MEGHATÁROZÁSA

A ts mutációk helyzetét az X kromoszómán a következő módon határoztuk meg: A kromoszómát teljes hosszában jelölő (térképhelyzet) y/0.0/ w/1.5/ cv/13.7/ v/33.0/ f/56.7/ car/62.5/ /Lindsley és Grell, 1968/, markerekkel /vonatkozási mutációkkal/ megvizsgáltuk, hogy az izolált mutációk a kromoszóma mely szegmentumába esnek. Ezt követően a ts mutációkat a kérdéses szegmentumban lévő, ismert mutációkkal térképeztük.

Az 1029. és 157. mutáns esetében, mely a cv/13.7/ és v/33.0/ közötti szegmentumba esik, cm/18.9/ ct^6/20.0/ oc/23.1/ v/33.0/ markerekkel térképeztünk. A kisérletek során a 1^{ts} mutációt hordozó legyeket és a markerekkel jelölteket 22°C-on kereszteztük. A kikelt ♀-ket kereszteztük, s 3 napig 22°C-on petéztettük /kontroll/, majd 29°C-ra helyezve őket naponta uj fiolába kerültek /igy növeltük a párhuzamosok számát/. A kisérlet kiértékelésekor a különböző rekombináns ♂-kat számoltuk.

A 844. és 451. mutációk helye a car/62.5/ és a

centromer közé esett. E szegmentumban található a $\underline{mal}^6$ és a $\underline{su\text{-}f}^{5A}$ deficiencia, ezért a 844., illetve a 451. mutáns ♂-ket $\frac{y\ dl49\ v\ sn^{X2}\ B^{M1}\ mal^6}{sc^8\ su\text{-}f^{5A}\ mal^3\ f}$ ♀-kel keresztezve megvizsgáltuk, hogy a kérdéses l^{ts} mutációk a deficienciák területére esnek-e. A legyeket előbb 22°C-on /kontroll/, majd 29°C-on petéztettük, s néztük a kelő utódok fenotipusát. Mivel a kisérletek eredményei alapján ugy tünt, hogy a 844. és 451. mutációk a su-f hőérzékeny alléljei, ezért ezt a $\underline{l}^{ts}$ és a su-f, valamint a $\underline{l}^{ts}$ és $\underline{su\text{-}f}^{ts}$ komplementációs vizsgálatával teszteltük. A legyeket 29°C-on petéztettük, s néztük, hogy kelnek-e $\underline{l}^{ts}/\underline{su\text{-}f}$, illetve $\underline{l}^{ts}/\underline{su\text{-}f}^{ts}$ heterozigóták.

2.5. A MUTÁCIÓK "IDŐBELI FÓKUSZÁLÁSA"

2.5.1. A letál-periódus és a fejlődési ciklus megállapitása

E kisérletek során szinkron petéket gyüjtöttünk 22°C-on /kontroll/ és 29°C-on, s fejlődésük alatt ezen a hőmérsékleten tartottuk az állatokat. A kiértékelés során a peték, az I., II., III. stádiumos lárvák, a bábok és az adultak számát határoztuk meg.

A legyeket, a szinkronitás érdekében, max. 1-2 óráig petéztettük Lewis-táptalajt /valamennyi kísérletünk során ezt használtuk/ tartalmazó Petri-csészébe, majd a petéket azonnal leszámoltuk. 24 óra multán a 29°C-on kelő, 36 óra mulva pedig a 22°C-on kikelő I. stádiumos lárvákat fiolába helyezés során számoltuk, fiolánként 50 egyedet téve. A Petri-csészében később még egyszer /22°C-on 12-16, 29°C-on pedig 8 óra mulva/ megszámoltuk az azóta kelt lárvákat. A mindvégig 22°C-on tartott fiolákból a kelt adultak számát határoztuk meg. A 29°C-on levő fiolákból a II. és III. stádiumos lárvákat, valamint a prepupa és pupa állapotu állatokat számoltuk. A lárva stádiumokat a szájszervekben található fogak /Bodenstein, 1950/, valamint a testméret alapján határoztuk meg. A bábok korára a szempigment megjelenéséből és a szárnyképződésből következtettünk /Tarasoff és Suzuki, 1970/.

A kisérlet során naponként regisztráltuk a törzsek fejlődési stádiumát, igy egyidejüleg azok 22°C-os és 29°C-os fejlődési ciklusát is megállapitottuk. A fejlődés időbeli lefutásának ismerete a TSP meghatározásához szükséges.

2.5.2. Hő-shift kisérletek

A TSP un. "hő-shift" kisérletekkel állapitható meg /Hoge, 1915/. Ez két részből áll: a "shift-up" kisérletekben különböző koru, permisszív hőmérsékleten nevelt állatokat viszünk fel restriktiv hőmérsékletre, mig a paralell végzett "shift-down" ennek forditottja, vagyis különböző koru restriktiv hőmérsékleten nevelt állatokat viszünk le permisszív hőmérsékletre, és követjük a kikelt és elpusztult állatok arányának változását.

Kisérleteinket az alábbi módon végeztük: 1-2 óráig fiolába petéztettük a legyeket 22°C-on a "shift-up" és 29°C-on a "shift-down" kisérletekhez. A szinkron gyüjtött petéket azonnal megszámoltuk, s azokat a fiolákat használtuk fel a shiftekhez, melyekben 60-110 pete volt.

A shift periódusok 24±3 órásak voltak /a fejlődő állatokat ilyen eltéréssel vittük a másik hőmérsékletre/, ahogyan ez az irodalomban leggyakrabban szokásos. 1-1 shift kisérletben 3-3 paralell szerepelt.

A "shift-down"-hoz történő petegyüjtés előtt 24 órával a szülőket 29°C-ra helyeztük, az esetleges embrió letális mutánsok felismerése végett, ui. az embriók fejlődése már a peterakás előtt megkezdődik.

A shift végrehajtása előtt regisztráltuk, hogy az állatok milyen fejlődési szakaszban voltak. A fejlődést a shiftet követően is ellenőriztük 24±3 óránként.

A kisérletek kiértékelése a kérdéses fiolából kelt felnőtt egyedek megszámlálásából, ivar szerinti megoszlásuk megállapitásából és az elpusztult bábok megszámlálásából állt.

A fentiekben ismertetett módon végeztük a kisérleteket mind az egyes mutánsokkal, mind pedig a nem komplementáló mutánsok keresztezéséből gyüjtött petékkel is.

2.5.3. Hőpulzus kisérletek

2.5.3.1. A hőpulzus elvégzése

A shift kisérletekkel nem tudunk különbséget tenni a folytonos és a megszakitott TSP között. Ezeket csak un. hőpulzussal tudjuk elkülöniteni. Ugyanakkor a hőpulzust fejlődő állatnak adva, sejtletális mutáció esetén a diszkuszok fejlődését is megzavarhatja, s morfológiai rendellenességek: szervduplikációk és deficienciák is létrejöhetnek az adult strukturákban /Arking, 1975; Russel, 1974/.

A hőpulzus kisérletek lényege, hogy a szinkron petékből 22°C-on fejlődő állatokat különböző fejlődési

József Attila Tudományegyetem Könyvtára SZEGED

stádiumban meghatározott időtartamra restriktiv hőmérsékletre visszük, majd visszatesszük a kulturákat 22°C-ra.

Kisérletünkben egyszeres és többszörös hőpulzusokat használtunk. Az egyszeres pulzusok 24, 48 és 72 órásak voltak: 6 db 24 órás: 0-24, 24-48, 48-72, 72-96, 96-120, 120-144; 3 db 48 órás: 0-48, 48-96, 96-120; 4 db 72 órás: 0-72, 24-96, 72-144, 144-216. A többszörös pulzusok a következők voltak: 3x24 órás: 24-48, 72-96 és 120-144; 2x24 órás: 48-72 és 96-120. A pulzusok tehát a teljes embrionális és lárvális fejlődési szakaszt átfogják /0-144/, sőt a legkésőbbi 72 órás pulzus a bábállapot kezdetét is.

A pulzus kisérletek kiértékelése egyrészt a shift kisérletekhez hasonló volt /pete, elpusztult bábok, kelt egyedek megszámlálása/, másrészt pedig a kikelő adultakon deficienciák és/vagy duplikációk előfordulását néztük /boncmikroszkóp, 25x nagyitás/ az imaginális diszkuszokból fejlődő szerveknél, valamint megállapitottuk, hogy e tekintetben mely pulzus a leghatásosabb.

E pulzus kisérleteket - a shift kisérletekhez hasonlóan - mind az egyes mutánsokkal, mind pedig a nem komplementáló mutánsok keresztezéséből származó utódokkal elvégeztük.

2.5.3.2. Az imágó korongok sejthalál-mintázatának vizsgálata

A hőpulzusnak kitett ts lárvák imágó korongjaiból fejlődő adult szerveknél deficienciákat és duplikációkat találtunk. Mivel e morfológiai rendellenességek alapja irodalmi ismereteink szerint az imaginális diszkusz egy részének elhalása, igy célszerünek láttuk a hőpulzusnak kitett mutáns lárvák diszkuszainak sejthalál-mintázatát megvizsgálni. Ezt Spreij /1971/ által kidolgozott acridine orange vitális festési technikával végeztük el: a festéket csak az elhalt sejtek veszik fel és élénk sárgászölden fluoreszkálnak UV fényben, mig az élő sejtek fluoreszcenciája igen gyenge.

A morfológiailag rendellenes legyeket legnagyobb arányban adó 48-96 és 96-144 órás hőpulzusnak tettük ki a mutáns lárvákat, illetve a nem komplementáló mutánsok keresztezéséből származó utódokat. A késői III. stádiumos lárvák szem-antenna-, szárny-, haltera-, 3 pár lábdiszkuszát mikroszkóp alatt /25x nagyitás/ kiboncoltuk a következőképpen: a lárvákat Ringerbe helyeztük, csipesszel széttéptük, s belső oldalát kesztyüujjszerüen kiforditottuk. Az igy jól hozzáférhető diszkuszokat csipesz és bonctü segitségével óvatosan letéptük. A boncolás során figyeltük az

esetlegesen előforduló morfológiai rendellenességeket is /diszkuszméret, zsirtest, nyálmirigy, Malpighi-edények, bél megjelenése/. Tárgylemezre acridine orange oldatot /1,6 x 10^{-5}M, Ringerben/ cseppentettünk s a diszkuszokat ebbe helyeztük. Fedőlemezzel lefedve, fluoreszcencia mikroszkóppal /Leitz, HBO 200W lámpa/ BG 12, BG 38 és K 490 szürőkombináció mellett, 60x-os nagyitással vizsgáltuk, fényképeztük.

3. E R E D M É N Y E K

3.1. A MUTÁNSOK IZOLÁLÁSÁNAK ÉS KOMPLEMENTÁCIÓS ANALIZISÉNEK EREDMÉNYE

Egymillió X kromoszómát kezeltünk EMS-sel, melyekből származó III. stádiumos lárvákat 48 órás hőpulzusnak tettük ki. E lárvákból fejlődő him utódok közül ts mutációra azokat teszteltük, melyek később, a vad tipusu legyek peterakástól számitott kelési idején /22°C-on 12-14 nap/ tul keltek, mivel a hőpulzus idején a hőérzékeny enzim normális működése gátolt, igy az állat fejlődése lelassul vagy leáll. Ilyen előtdusitás után 500 ♂-t vizsgáltunk meg pártenyészetben, s közülük ötvenet találtunk hőérzékenynek. A komplementációs analizis során 2 párt találtunk, melyek nem komplementáltak: 1029. és 157., valamint 844. és 451. A nem komplementáló mutánsok azonos gének különböző alléljei lehetnek.

3.2. A SEJT-AUTONÓMIA MEGHATÁROZÁSA

A 29°C-os kisérletekben egyik mutánsunk esetében sem kelt hemizigóta foltot hordozó a $\frac{ywl^{ts}}{R}$ nőstények között, mig a kontroll kisérletekben

nagy arányban fordultak elő gynanderek /1. táblázat/. Ugyanakkor a 29°C-on kelt $\frac{ywl^{ts}}{R}$ nősténye szá-ma kb. fele az ezen a hőmérsékleten kelt $\frac{Binsn}{R}$ nőstények számának /1. táblázat/. Ez arra utal, hogy a hemizigóta foltot hordozó $\frac{ywl^{ts}}{R}$ nőstények elpusztultak a restriktiv hőmérsékleten. Eredményeink alapján mutánsainkat autonóm sejtletálisoknak mondhatjuk.

3.3. A MUTÁCIÓK TÉRKÉPHELYZETE

A y w cv v f car térképezés során azt találtuk, hogy a 157. és 1029. mutációk a kromoszóma cv/13.7/ és v/33.0/ közötti szegmentumába esnek, mig a 844. és 451. mutációk a car/62.5/ és a centromer közé.

Ezt követően a 157. és 1029. mutációk helyzetét cm/18.9/ ct^6/20.0/ oc/23.1/ v/33.0/ markerekkel határoztuk meg, s azt találtuk, hogy az oc/23.1/ és v/33.0/ között a 23.8±0.6 helyre térképeződnek az X kromoszómán. /2. táblázat/, 15. ábra

A car és a centromer között található a mal^6 és a $su\text{-}f^{5A}$ deficiencia. A 844. és 451. mutáns ♂-ket

$\frac{y\ d149\ v\ sn^{X2}\ B^{M1}\ mal^{6}}{sc^{8}\ su\text{-}f^{5A}\ mal^{3}\ f}$ σ -kel keresztezve

$\frac{y\ d149\ v\ sn^{X2}\ B^{M1}\ mal^{6}}{1^{ts}}$ σ utódok keltek, mig

$\frac{sc^{8}\ su\text{-}f^{5A}\ mal^{3}\ f}{1^{ts}}$ σ utódok nem. Ez alapján lehetségesnek látszott, hogy az izolált mutációk a su-f hőérzékeny alléljei, ezt azonban a 1^{ts} mutá nsok és a su-f, illetve a $su\text{-}f^{ts}$ komplementációs vizsgálatával egyértelmüen kizártuk. A $su\text{-}f^{5A}$ deficiencia a 20A-20F régiót fedi át, igy kisérleteink alapján a 1^{ts} mutáció helye a 844. és 451. mutánsok esetén e régióban lehet /15. ábra/.

3.4. A MUTÁNSOK LETÁL- ÉS HŐÉRZÉKENY-PERIÓDUSA

3.4.1. A letál-periódus meghatározásának eredménye

A 22°C-os adatokat - mely a LP-n kivül a hőshift és hőpulzus kisérletek kontrollja is - a 3. táblázat tartalmazza. Látható, hogy permissziv hőmérsékleten a peték több mint 70%-ából kelt adult légy mind az egyes mutánsoknál, mind pedig a nem

komplementáló mutánsok keresztezéséből származó utódoknál. Ez alól kivétel az 1029. törzs, melynek csak 40 %-a kelt ki 22°C-on, azonban 18°C-on jó a kelési arány /szintén több mint 70 %/. E törzsben tehát a mutáció penetranciája a permissziv szakaszon belül is hőmérsékletfüggő. Ugyancsak alacsony arányban kelt /a peték 53 %-ából/ adult (♂+♀) az 1029.♀ ⊗ 157.♂ keresztezésből is, a kelő 1029.♂-k mérsékelt kelése következtében.

A mutánsok LP-t a fejlődés során az 1. ábra mutatja. Restriktiv hőmérsékleten egyetlen egyed sem kelt ki sem az egyes l^{ts} mutációt hordozó törzsekből, sem pedig az azonos komplementációs egységbe tartozó mutánsok heterozigótájából. Munkánk folyamán a LP-t többször ujra teszteltük, s ennek során a 451. törzset leakynek találtuk.

A 451. és 844. mutánsok LP-a polifázikus. A LP hossza különböző a két mutáns esetében: kezdete azonos fejlődési stádiumra esik /L_1/, de a 844. mutánsnál a L_2-ben végetér, mig a 451. mutáns esetében a báb állapotot is átfedi /1. ábra/.

Az 1029., 157. mutánsok és 157./1029. heterozigóta jellemzője, hogy restriktiv hőmérsékleten a tojásburokban látható az I. stádiumos lárva, mely ott vagy épp a kikelés közben elpusztul. Az esetek egy

részében ki is kel a tojásból, de növekedés nélkül elpusztul.

A 157. mutáns és a 157./1029. heterozigóta sajátsága, hogy a peték kevesebb mint 10 %-a II. vagy késői III. stádiumos lárvaként pusztul el /1. ábra /. Ez esetben a III. stádiumos lárvák e fejlődési fázisa megnyulik, olykor 20 napon tul is. E kései III. stádiumos lárvákat felboncoltuk. Morfológiai rendellenességet sem az imágó korongokban, sem egyéb szervekben nem találtunk, ugyanakkor azonban a diszkuszokban nagy mértékü volt a sejtelhalás. Megvizsgáltuk az imágó korongok in vitro evaginációját, s erre képtelennek találtuk őket.

Az azonos komplementációs csoporthoz tartozó mutánsok heterozigótájának LP-vizsgálatakor anyai hatást nem tapasztaltunk: a reciprok keresztezésekből származó utódok LP-a azonos fejlődési stádiumra esett /1. ábra/. A heterozigóták LP-a a szülői genotipusu mutánsokhoz hasonló volt: a 157./1029. heterozigóta esetében is találtunk - a 157. mutánshoz hasonlóan - néhány II. és III. lárva stádiumig tulélő lárvát /1. ábra/. A 451./844. heterozigóta LP-a polifázikus /1. ábra/: a 844. mutáns LP-ánál jobban elnyult, de a prepupa és pupa állapotot - melyre a 451. mutáns LP-a áthuzódik - egyetlen egyed sem érte

el. A 451./844. heterozigóta LP-ának vége végeredményben a 451. és 844. mutáns LP-ának vége között helyezkedik el.

3.4.2. A vizsgált törzsek fejlődési ciklusa

A fejlődési szakaszok időbeli változásának alapjául Arking /1975/ 22°C-on és 29°C-on Oregon R vad törzzsel végzett meghatározása szolgált. Az egyes mutánsok és az azonos komplementációs egységbe tartozó mutánsok heterozigótájának fejlődési kinetikája általában e vad törzsének megfelelő volt 22°C-on. Ez alól kivétel az 1029. és 844. mutáns. Az 1029. törzs fejlődése elnyultabb /2. ábra/. A 844. mutáns esetében a bábvedlés 1 nappal hosszabbra nyulik /5. ábra/.

A 29°C-os fejlődésre vonatkozó adatokat a 2-7. ábrán szemléltetjük. Az eredmények alapján megállapitottuk, hogy a vizsgált mutánsok növekedése a LP-ig lépést tart a vad lárvák fejlődési ütemével. Jellemző, hogy a halált lassubb növekedés előzi meg, s hogy a fejlődési stádiumra jellemző nagyságot elért mutáns állat "túlél" egy kevés időt, mielőtt a halál bekövetkezik. /Pl. a 157. mutáns III. stádiumot elért egyede olykor 20 napon tul is él/. Ennek

következtében azon fejlődési állapot időtartama, melyben a halál bekövetkezik, megnyulik. Ez alól kivételek a 157., 1029. mutánsok, valamint 157./1029. mutáns heterozigóta I. stádiumos lárvái, melyek a tojásból való kikelés alatt, vagy azt követően növekedés nélkül elpusztultak.

3.4.3. Termoszenzitiv-periódus

A hő-shift kisérletekben kikelt adultak számát a peték számának %-ában kifejezve és az idő - ezen keresztül a fejlődési stádium - függvényében ábrázolva megállapitható a TSP kezdete és vége a következő módon: a TSP kezdetének azt az időpontot tekintjük, amikor a "shift-down" kisérletekben szignifikáns egyedszám csökkenést; végének pedig azt az időpontot, amikor a "shift-up" kisérletekben szignifikáns egyedszám növekedést észlelünk.

A fejlődés különböző szakaszaiban adott 24 órás hőpulzus kisérletek során a kelt adultak számában szignifikáns csökkenést és azt követő emelkedést nem tapasztalunk. Ez alapján mutánsaink TSP-a folyamatos.

A vizsgált mutánsok adatait grafikonokon folaltuk össze /2-7. ábra/, mely alapján a TSP - a fejlődés figyelembevételével - a következőképpen alakul:

1029.: az embrióban kezdődik, s végighuzódik mind-
három lárva stádiumon, valamint a báb állapot
kezdetén /2. ábra/;

157.: az embriótól a bábozódás befejezéséig tart
/3. ábra/;

1029./157.: az embriótól a bábozódás befejezéséig
huzódik /4. ábra/;

844.: az embrió állapotot, a három lárva stádiumot,
valamint a báb állapot kezdetét fedi át /5.ábra/;

451.: az embriótól a bábozódás befejezéséig tart
/6. ábra/;

844./451.: az embriótól a bábozódás befejezéséig
huzódik /7. ábra/.

3.5. A HŐPULZUS KISÉRLETEK EREDMÉNYEI

3.5.1. Morfológiai rendellenességek

A hőpulzust követően abnormális adult struktu-
rákat a 157., 1029. mutánsokban és a 157./1029.
heterozigótában találtunk, mig a 844., 451. mutánsok-
ban és a 844./451. heterozigótában ezek csak elvétve
fordultak elő /4. táblázat/.

A 157., 1029. mutánsoknál és a 157./1029.
heterozigótában szem deficienciát /9. ábra/ és a

Attila Tudományegyetem Könyvtára SZEGED József

haltera deficienciáját vagy duplikációját /10. ábra/ találtuk /4. táblázat/. Szem deficienciát csak a 96. óra utáni pulzusokból kaptunk. A deficienciát a szem horizontális középrészén találtuk, elölről és/vagy hátulról indult ki, s a szem vertikális középvonalát sohasem lépte át. Iránya a szem szélétől annak közepe felé tartott. A haltera abnormális fejlődését csak a 157. mutánsban és 157./1029. heterozigótában tapasztaltuk; esetükben a 48^h és 96^h közötti időintervallumot magukba foglaló hőpulzusok voltak hatásosak mind a deficiencia, mind pedig a duplikáció kiváltására: 48^h előtt egy esetben sem, 96^h után ritkán találtunk haltera rendellenességet. Ez utóbbi feltehetőleg a fejlődés során fokozódó aszinkronitással magyarázható. A haltera volt az egyedüli struktura mely duplikálódott; s a deficienciák és duplikációk megközelitőleg egyforma gyakorisággal fordultak elő. A különböző hőpulzusokat követően az egyedeket átvizsgálva olykor találtunk az emlitetteken kivül a 157. mutánsban és a 157./1029. heterozigótában antenna, szárny, láb; az 1029. mutánsban pedig láb deficienciát /4. táblázat/.

A 844., 451. mutánsokban és a 451./844. heterozigótában elvétve találtunk rendellenességet, ezek: antenna, szárny, haltera és láb deficiencia /4.táblázat/.

Valamennyi mutánsunknál meglehetősen gyakori volt a nyitott szájszerv, valamint szőr deficiencia és/vagy duplikáció a toron. E rendellenességek valamennyi hőpulzus után előfordultak.

3.5.2. A hőpulzusok hatása az imágó korongokra

A legradikálisabb rendellenességeket produkáló 48-96 és 96-144 órás hőpulzusoknak kitett lárvák imaginális diszkuszait késő III. stádiumos korban kiboncolva azok méretét normálisnak találtuk. E lárvák azonban a késő III. stádiumot 1-2 nappal később érik el, mint a végig 22°C-on tartott állatok. A diszkuszok sejt-halál mintázatát Spreij /1971/ módszerével vizsgáltuk. A 844., 451. mutánsokban és a 844./451. heterozigótában normális volt a sejt-halál mintázat /30 lárvából 2 kivételével/, míg a 157., 1029. mutánsok és az 1029./157. heterozigóták valamennyi vizsgált korongjában /szem-antenna, szárny, haltera, 3 pár láb/ fokozott volt a sejtek pusztulása. Összehasonlításként a mutánsok 22°C-on nevelt lárváinak imágó korongjai szolgáltak /11., 12. ábra/.

4. E R E D M É N Y E I N K M E G V I T A T Á S A

4.1. A LETÁL-PERIÓDUS ÉS AZ AZONOS KOMPLEMENTÁCIÓS CSOPORTBA TARTOZÓ MUTÁNSOK LETÁL-PERIÓDUSÁNAK ÖSSZEHASONLITÁSA

Hadorn /1948, 1951/ Drosophila letális mutánsok vizsgálata során megállapitotta, hogy az egyes fejlődési stádiumokban a halál bekövetkezésének valószinüsége különböző. Azon fázisokat, melyben a halál a legvalószinübb "interfázisok" választják el, mely alatt nem pusztulnak el állatok. A halál bekövetkezésének esélye a következő fázisokban a legnagyobb: korai és késői embrió periódus, az I. lárva stádium kezdete, a III. lárva stádium eleje és vége, a prepupális állapot eleje, pupáció, pupális periódus s az imágó kelését közvetlenül követő időszak. E letális mutánsokra megállapitott periódusok jól egyeznek Suzuki /1970/ ts mutánsokkal végzett kisérleteinek eredményeivel, melyeknél a LP leggyakrabban az embrió-I. stádiumos lárva, illetve a III. stádiumos lárva-báb állapot közé esett. Ennek valószinü magyarázata az, hogy a fejlődésnek ezen szakaszaiban nagy morfogenetikus változások történnek, s az egyedfejlődésben szerepet játszó

gének nagy része aktiválódik /Oster, 1954; Suzuki, 1970/.

Mutánsaink LP-a e megállapitásokat alátámasztja.

Az 1029. és 157. mutánsok un. "határ letálisok" /Hadorn, 1951/./1. ábra/. Ezek jellemzője, hogy részben normális megjelenésü I. stádiumos lárvaként pusztulnak el, részben pedig még a tojásban elhalnak a lárvák. Kérdéses mutánsaink halála a fejlődés e szakaszában következett be, sőt a lárvák nagy része épp a tojásból való kibuvás közben pusztult el. Felmerül a kérdés, hogy e mutánsokat monofázikus vagy difázikus letálisnak tekintsük-e. Hadorn /1951/ szerint az embrió-lárva határeset monofázikus LP-nak tekintendő, mivel az I. stádiumos lárvák ez esetben szignifikáns növekedés nélkül pusztulnak el, s igy figyelmen kivül hagyható, hogy a halál az embrió periódus végén vagy az I. lárva stádium kezdetén következik-e be. Ilyen "határ letális" mutánst irt le pl. Oster /1954/, Shannon és mtsai /1972/, Tarasoff és Suzuki /1970/.

A 157. mutánsra jellemző, hogy a lerakott peték kevesebb mint 10 %-a II. vagy késői III. stádiumos lárvaként pusztul el /1. ábra/. E néhány "tulélő" lárva megjelenését a mutáció penetranciájának kis variálásával magyarázhatjuk /Shannon és mtsai, 1972/.

A 844. és 451. mutánsok di- illetve polifázikus letál-periódusa részben a II. lárva stádiumra esik /1. ábra/. E fejlődési szakaszt Hadorn /1948/ inszenzitiv interfázisnak tekintette, mely alatt a letális mutáció ritkán vagy egyáltalán nem okoz halált. Shannon és mtsai /1972/ letális mutánsokat vizsgálva megállapitották, hogy e fejlődési stádiumban sem ritka a halál bekövetkezése, főleg polifázisos LP részeként. Hőérzékeny Drosophila mutánsoknál szintén leirtak II. stádiumos letálist /Tarasoff és Suzuki, 1970/.

A 451. mutáns a kisérletek során leakynek mutatkozott. Ez a ts mutánsok esetében viszonylag gyakori jelenség, mely könnyen értelmezhető a hőérzékenység molekuláris mechanizmusának ismeretében. E szerint a ts mutáció eltérő konformációt eredményez /Jockusch, 1966/. /Részletesebben ld. 1.1.2./. A géntermék nincs teljesen "elrontva", igy előfordulhat, hogy a mutáció penetranciája nem 100%-os.

Az egy komplementációs csoporthoz tartozó mutánsok letál-periódusa Shannon és mtsai /1972/ vizsgálatai szerint általában azonos fejlődési szakaszra esik. Az általunk vizsgált komplementációs csoportok egyikéhez tartozó mutánsok /157. és 1029./ LP-a egyezett /1. ábra/, mig a másik komplementációs

csoport tagjainál /451. és 844. mutánsok/ a LP csak részben esett azonos fejlődési stádiumra /1. ábra/. Komplementációs csoporton belüli LP eltéréseket mind letális, mind hőérzékeny letális mutánsokra leirtak. Shannon és mtsai /1972/ 13 letális komplementációs csoport közül - mindegyikük több mutánst tartalmazott - hármat talált melynek tagjai különböztek LP-ukban. Két csoport mutánsainak LP-a csak részben esett azonos fejlődési stádiumra, mig a harmadik csoport két tagjának LP-a teljesen különböző volt. Az Arking /1975/ által izolált ts sejt-letális mutánsok 16 komplementációs csoportba tartoztak, közülük 3 tartalmazott két vagy több mutánst. Ezek LP-a részben azonos fejlődési szakaszra esett, azonban a LP kezdete és vége általában eltérő volt a csoport tagjainál.

A LP komplementációs csoporton belüli eltéréseire legkézenfekvőbb magyarázatot a genetikai háttér különbözősége ad. A genetikai háttér befolyásolja a LP hosszát, mint azt Vincze /1976/ ts letál-mutánsok izogenizálás előtti és utáni LP-ának összevetésével kimutatta. Ennek értelmében a 844. és 451. mutánsok polifázisos LP-a, valamint a két, azonos komplementációs csoportba tartozó mutáns eltérő hosszuságu LP-ának /1. ábra/ legvalószinübb magyarázata a genetikai háttér befolyása.

Az azonos komplementációs csoporthoz tartozó mutánsok heterozigótájának /157./1029., valamint 844./451./ LP-a a szülőkéhez hasonló volt. /1. ábra/. A 844/451. heterozigóták LP-ának vége a két szülő letális fejlődési szakaszának vége közé esett. Mivel a 844. és 451. mutánsok kisebb LP eltérését legkézenfekvőbben a genetikai háttér különbözőségével magyarázhatjuk, e feltételezés elfogadásával érthető az is, hogy a két mutáns közös utódaiban, ahol mindkét génháttér képviselve van, a LP kissé módosul.

4.2. AZ EGY KOMPLEMENTÁCIÓS CSOPORTBA TARTOZÓ MUTÁNSOK TERMOSZENZITIV-PERIÓDUSÁNAK ÖSSZEHASONLITÁSA

A TSP-t hő-shift kisérletekkel állapitottuk meg. Ennek során 24 óránként vittük más hőmérsékletre a kulturákat. Ez a TSP meghatározására kielégitő eredményt adott. Ennél rövidebb intervallumok használata esetleg csak a már meghatározott TSP kezdetének és végének pontositására célszerü. Az általunk használt 24 óránkénti shiftek általánosságban egyeznek az irodalomban leirtakkal /Suzuki és Procunier, 1968; Arking, 1975/.

Ha a Drosophila kulturák teljes szinkron tartására lenne lehetőség, ugy a TSP kezdetét az az

időpont jelentené, amikor a "shift-down" kisérletekből egyetlen adult sem kelne ki; a vége pedig az az időpont lenne, amikor "shift-up" kisérletek során valamennyi állat adulttá fejlődne. Sajnos azonban a szinkron tenyésztés a Drosophila munkákban igen nagy probléma. Gyakorlatilag csak szinkron petéztetés lehetséges, az embriók fejlődése ui. a peterakás előtt megkezdődik, igy már az első stádiumos lárvák kelése sem szinkron, és ez az aszinkronitás fokozódik az állat fejlődése során. Ha a szinkron gyüjtött petékből kelt első stádiumos lárvákat szük időintervallumban szedjük le, és uj fiolába helyezzük át őket, a szinkronitás a második és harmadik stádiumra ismét széthuzódik. Ennek az aszinkronitásnak a következtében a hő-shift hatások sem ilyen egyértelmüek, amelyet a 8. ábrán mutatunk be. Igy a TSP meghatározásával kapcsolatban kompromisszumra kényszerülünk; a szignifikáns egyedszám változást tekintjük a TSP kezdetének és végének /Suzuki és Duck, 1967; Baillie és mtsai, 1968; Suzuki és Procunier, 1968; Suzuki, 1970; Tarasoff és Suzuki, 1970; Suzuki, 1974; Russel, 1974; Arking, 1975/.

Mutánsaink TSP-át a 2-7. ábra mutatja. Mint ezeken látható, valamennyi mutánsunk TSP-a több fejlődési stádiumot folytonosan átfed.

A TSP-t /2.-7. ábra/ és LP-t /1. ábra/ összevetve

azt találjuk, hogy a TSP általában tulhuzódik a LP-nak megfelelő fejlődési stádiumon. Tehát ha permissziv hőmérsékleten neveltük az állatokat a LP-nak megfelelő fejlődési szakaszig, s csak azután vittük restriktiv körülmények közé, akkor is letalitást eredményezett a hőhatás. Ez alól csak a 451. mutáns kivétel, melynek polifázisos LP-a a TSP végénél tovább tart; valamint a 157. mutáns néhány késő III. stádiumos lárvaként elpusztuló egyede, melynek halála a TSP végén következik be.

Az ugyanazon komplementációs csoporthoz tartozó mutánsok TSP-át egyezőnek tekinthetjük. A 157. és 1029. mutánsok TSP-a egyaránt az embrió stádiumban kezdődik és a bábvedlést követően ér véget. A két mutáns TSP-ának vége ugyan 3 nappal eltér /2. és 3. ábra/, de ha figyelembe vesszük az 1029. mutáns 22°C-on is lassult fejlődését, akkor a két, azonos komplementációs csoporthoz tartozó mutáns TSP-ának vége megközelitőleg /1 nap eltéréssel/ egyezik. Ez az 1 nap különbség megitélésünk szerint figyelmen kivül hagyható, mivel az a fejlődés azonos szakaszára, a bábozódást közvetlenül követő időszakra esik. Igy a két, azonos komplementációs csoportba tartozó mutáns TSP-át azonosnak tekinthetjük. Korábbi munkánk során azonos ts mutáns törzs két vonalának eredményét összevetve szintén azt tapasztaltuk,

hogy a génháttér befolyásolta a TSP hosszát, de nem befolyásolta azt a fejlődési stádiumot, melyben a restriktiv hőmérséklet letalitást okozott. A 157./1029. heterozigóta TSP-a a 157. mutánséval egyezik /3. és 4. ábra/. Ez annak a következménye, hogy a 157./1029. lárvák fejlődése a 157.-hez hasonló. A reciprok keresztezések /157.♀ ⓧ 1029.♂ és 1029.♀ ⓧ 157.♂/ ugyanarra az eredményre vezettek.

a 451. mutáns hő-shift kisérleteinek értékelését nehezíti, hogy a "shift-down" nagy szórást mutat. Ez valószinüleg annak a következménye, hogy e mutánsunk leaky, és igy a hő-szenzibilitás egyedi, ezen keresztül kulturánkénti eltérése jobban befolyásolja eredményeinket, mint más mutánsok esetében.

A 844. és 451. mutánsok TSP-a egyaránt az embrió stádiumban kezdődik /5. és 6. ábra/. A "shift-down" kisérletekben a petegyüjtés előtt 24 órával a szülőket 29°C-ra helyeztük, igy a peterakás előtt már fejlődésnek induló embriót érte a restriktiv hőhatás. Ennek következtében a 0 órás shiftek kelési aránya is szignifikánsan csökkent a kontrolléhoz viszonyitva. Az 1-2 napos"shift-down" nem okoz nagyobb arányu letalitást. Ezt az e mutánsok esetében rövidnek bizonyuló hőhatással magyarázhatjuk./A 2 napos restriktiv hőmérséklet rövidségének magyarázatát a 4.3. pont alatt adjuk./

A feltételezést a hőpulzus kisérletek tapasztalatai is alátámasztják: a 2 napos hőpulzusokat követően az érett III. stádiumos lárvák imágó korongjaiban a sejthalál mintázatot általában /30 lárvából 2 kivételével/ normálisnak találtuk. A két, imágó korongjai egy részében fokozott sejtpusztulást mutató lárva léte bizonyitja, hogy a mutáció hat az imágó korongok sejtjeiben; a 30:2 arány pedig azt mutatja, hogy e hatás maradéktalan érvényesüléséhez a 2 napos hőpulzus nem elegendő. A 844. és 451. mutánsok TSP-ának vége a fejlődés figyelembevételével /a 844. bábvedlése 1 nappal megnyult/ 1 nap eltérést mutat /5. és 6. ábra/: a 451. esetében a bábvedlés befejezésekor, a 844.-nél pedig az azt követő napon ér véget. A két mutáns TSP-t - az előző komplementációs csoportnál leirt meggondolás alapján - azonosnak tekintjük. A 844./451. heterozigóta TSP-a a szülői genotipusu mutánséhoz hasonló /5., 6. és 7. ábra/, és a reciprok keresztezések /844.♀ ⊗ 451.♂ és 451.♀ ⊗ 844.♂/ ugyanarra az eredményre vezettek.

Eredményeink alapján mindkét komplementációs csoport TSP-a az embrió állapotban kezdődik és a bábozódást követően ér véget. Mivel a bábozódás alatt az evagináció befejeződik /ld. 1.2.1./, igy elmondhatjuk, hogy mutánsaink az evagináció után érzéketlenek a restriktiv hőmérsékletre. A TSP valószinüleg a

géntermék felhasználásának idejét jelzi /Tarasoff és Suzuki, 1970/, tehát mutánsaink olyan enzimben vagy strukturfehérjében hibásak, melyre az evaginációt után már nincs szükség.

A TSP fontosabb információt ad a mutációról mint a LP, mivel a TSP a géntermék felhasználásának idejét, esetleg a kérdéses gén ontogenetikus aktivitásának idejét jelzi /Tarasoff és Suzuki, 1970/, mig a LP a géntermék hiányának végeredményét. A TSP ugyanakkor pontosabb jellemzője is a ts mutánsoknak mint a LP, mely jelentősen módosulhat a shift kisérletek során /Suzuki, 1970/. Vizsgált mutánsaink esetében a TSP egyezett az azonos komplementációs csoport tagjainál, a LP is azonos volt a 157. és 1029. mutánsoknál, mig a 844. és 451. törzsek polifázisos LP-a részben eltért. Ez utóbbi mutánsok LP-ának különbségét a TSP azonossága mellett - figyelembe véve, hogy a TSP fontosabb és stabilabb jellemzője a ts mutánsoknak mint a LP /ld.fent/ - elhanyagolhatjuk.

4.3. AZ IMÁGÓ KORONGOK SEJTHALÁL-MINTÁZATA ÉS A MEGFELELŐ ADULT SZERVEK RENDELLENESSÉGE KÖZÖTTI ÖSSZEFÜGGÉS

Az imágó korongok fokozott sejtpusztulása és az

adult szerv deficienciája és/vagy duplikációja közötti összefüggésre a determináció vizsgálata során derült fény. E kisérletekben az imágó korongok in situ részekre osztását /Bryant, 1971/, és a korongok szándékos sértését: az egyes részek sebészi kiirtását /Schubiger, 1971; Szabad, szóbeli közlés/ valamint a korai lárvák besugárzását /Postlethwait és Schneidermann, 1973; Postlethwait, 1975/ végezték el. A determináció tanulmányozásának legujabb lehetőségét a sejt-letális hőérzékeny mutánsok adják /Arking, 1973, 1975; Russel, 1974/. A ts sejtletális mutánsokkal végzett kisérletekben - mint azt jelen munka is mutatja - ugyanazon hőmérsékleti feltételek, melyek a vad törzsétől eltérő sejthalál-mintázatot idéznek elő az imaginális diszkuszokban, ugyancsak hatásosak a megfelelő adult szervek deficienciáinak és/vagy duplikációinak kiváltásában.

Számos nem hőérzékeny mutáció ismert, mely duplikációkat okoz. Ezek közé tartoznak a reduplicated /Hoge, 1915/, crippled /Komai, 1926/, extra organs /Schalet, 1972/, eyeless /Sang és Burnet, 1963/, vestigial /Waddington, 1939/, scalloped /Vyse és James, 1972/ és erosion /Inouye és Takaya, 1964/. /A mutánsok leirását ld. Lindsley és Grell, 1968./ Fokozott sejthalál kimutatható ezek közül az eyeless szem diszkuszában /Fristrom, 1969/, a vestigial szárny diszkuszában

József Attila Tudományegyetem Könyvtára SZEGED

/Fristrom, 1968/ és a scalloped esetében /Arking, 1975/.

A sejthalálnak a normális fejlődés alatt specifikus mintázata van az imágó korongokban mint azt Sarcophagaban /Whitten, 1969/, valamint Calliphorában és Drosophilában /Spreij, 1971/ megfigyelték. Az elpusztult sejtek kimutatására acridine orange festést alkalmaztunk, mint az az irodalomban leggyakrabban szokásos /Spreij, 1971; Russel, 1974; Arking, 1975/. E célra az emlitett eljárás mellett Russel /1974/ és Arking /1975/ toluidin kék festést is alkalmazott. E technikával Russel az imágó korongokban szabálytalan nagyságu kromatinokat, sejttöredékeket mutatott ki. A két eljárás hasonló eredményre vezettt, igy mi megelégedtünk az acridine orange festéssel.

Vad tipusu imágó korongok elpusztult sejtjeinek térbeli megoszlását vizsgálva Spreij /1971/ a sejthalál lokalizált mintázatát figyelte meg. Arking /1975/ ugyanezt találta a sejt-letális ts mutánsok diszkuszait restriktiv hőpulzus után vizsgálva. Russel /1974/ tapasztalatai szerint viszont random a sejthalál. Az általunk vizsgált mutánsok imágó korongjaiban a hőpulzus után a fokozott sejtpusztulást szintén meghatározott helyen találtuk, mely különösen szembetünő volt a szemantenna diszkuszban /11., 13. ábra/. Elképzelhető, hogy a sejthalál korongon belüli lokalizációja a génhatás

celluláris specificitásának visszatükröződése /Arking, 1975/.

Bryant /1974/ modellezte a hő-indukált sejthalált követő lehetséges fejlődési irányokat /14. ábra/. E szerint a hőpulzus az imágó korongok sejtjeinek jelentős részét elpusztitja, de nem az összeset. Ez vitalis festéssel kimutatható. Az épen maradt sejtek a hiányzó részeket regenerálni, vagy pedig a meglevőket duplikálni képesek. Ez felveti annak a lehetőségét, hogy a regenerációhoz hasonló folyamat következtében jön létre duplikáció. Ellenkező esetben az elpusztult sejtek helyén az adult strukturában deficiencia lép fel.
E feltételezést Russel /1974/ vizsgálatai alátámasztják: a hőpulzusnak kitett gynander lárvákból fejlődő adultakban duplikációt csak a vad tipusu szövetekben talált, azaz ha a mutáns szövet elpusztul, az ép, vad tipusu képes azt pótolni valami módon. A modellből következik, hogy nem csak a sejtek elpusztulásától függ, hogy kialakul-e a sejthalált követően deficiencia, hanem a regenerációs képességtől is, ez azonban feltehetőleg helyhez kötött a diszkuszban /Bryant, 1971; Schubiger, 1971; Postlethwait és Schneidermann, 1973/.

Bryant /1974/ hipotézise szerint a deficiencia megelőzi a duplikációt: a duplikáció a deficiencia javitása révén jön létre. Ezt támasztja alá az a tény

hogy a duplikáció csak deficienciával együtt fordul elő, mig deficiencia megjelenése a duplikációtól független /Arking, 1975; Russel, 1974/. Vizsgált mutánsaink ezt szintén igazolják. A 157. és 1029. mutánsok esetében a haltera deficienciát és duplikációt egyaránt mutatott, de egyedül csak duplikáció nem fordult elő. E mutánsokban a szem csak deficienciát mutatott, duplikáció sohasem fordult elő.

Bryant /1974/ modellje jól egyezik azzal a tapasztalattal - mint az jelen munkában is látható /4. táblázat/ - hogy deficiencia gyakrabban fordul elő mint duplikáció; valamint azzal, hogy a hőpulzust a fejlődés késői stádiumában adva a deficienciák gyakorisága magasabb mint ha az korábban éri a lárvákat /Russel, 1974; Arking, 1975/. Ez feltételezhetően annak a következménye, hogy a fejlődés korábbi szakaszában adott hőpulzus után a regenerációra hosszabb idő jut, igy az teljes. Duplikációk inkább csak a korai hőpulzus esetén találhatók, mig deficienciák a későinél is /Russel, 1974; Arking, 1975/. A modell alapján ezt ugy értelmezhetjük, hogy a korai hőpulzust követően a hiányzó részek duplikációval történő pótlására elegendő idő áll rendelkezésre, mig a későbbi hőpulzusok után már nincs idő a duplikációra.

A morfológiailag abnormális strukturák megjelenése

nem csak a sejthalál diszkuszon belüli elhelyezkedésétől függ, hanem ugyancsak függ az érintett terület kiterjedésétől és a sejthalál bekövetkezésének sebességétől is /Arking, 1975/. Ezzel magyarázható az a tény, hogy az általunk vizsgált törzsek közül a 844. 451. és a 844./451. heterozigóták esetében egyetlen pulzust követően sem találtunk nagyobb arányban rendellenes megjelenésü adult strukturát /4. táblázat/. E törzsek imaginális diszkuszaiban a sejthalál-mintázat általában normális volt a 48-96 és 96-144 órás hőpulzusnak kitett lárvákban. A nem komplementáló mutánsok és azok heterozigótája mind a sejthalál-mintázatban, mind pedig a hőpulzust követően az adult szervek megjelenésében hasonlóak voltak. E mutánsok lassu sejtpusztulására utal az is, hogy a 72 órás hőpulzusokat követően az adult kelési aránya meglehetősen magas volt.

Arking /1975/ vizsgálatai során szintén talált egy hőpulzusra hasonlóan viselkedő törzset (1(1) ts-5141). E mutánsok esetében a mutáció hosszu időt igényel a sejtek elpusztitásához, igy a megölt sejtek viszonylag gyors pótlása feltételezhetően biztositja az imágó korong fejlődési folytonosságát. Elképzelhető azonban az is, hogy a restriktiv hőmérsékletnek kitett fejlődő állatok halálának oka nem

az imágó korongok, hanem valamelyik belső szövet hőérzékenysége.

A morfológiai rendellenességek előfordulása az egyes mutánsokban nem véletlenszerü /4. táblázat; Russel, 1974; Arking, 1975/: egyes szervek kizárólag deficienciára hajlamosak, mások e mellett duplikációt is mutatnak, mig az illető mutáns bizonyos adult strukturái teljesen épek maradnak. Feltételezhetően ez a szövet-specifikus génaktivitás következménye /Arking, 1975/. Lehetséges az is, hogy mindez a regenerációhoz való képesség helyhez kötöttségének következménye /Bryant, 1971; Schubiger, 1971; Postlethwait és Schneidermann, 1973/.

A 157., a vele nem komplementáló 1029. mutánsokban, valamint a 157./1029. heterozigótában rendellenességet nagyobb arányban /több mint 20 %/ a szem és a haltera mutatott. A deficienciák, duplikációk vagy a szerv egy részére terjedtek csak ki, vagy pedig az egész szervet érintették.

A szem rendellenessége mindig csak deficiencia volt. Russel /1974/ hőpulzus kisérletei során ugyancsak a szem volt - az antenna és a lábak mellett - az egyik leggyakrabban érintett adult szerv, s szintén csak deficienciát mutatott. Arking /1975/ 22 sejtletális ts mutáns hőpulzusa után 15-ben talált

kisebb-nagyobb arányu szem-rendellenességet, s ezek döntő többsége deficiencia volt /deficiencia:duplikáció = 37:1/. A nem komplementáló mutánsok s azok heterozigótájának szem-antenna diszkuszában a sejthalál mintázat valamint a szemdeficiencia megjelenése hasonló volt.

A haltera deficiencia mellett duplikációt is mutatott a 157. mutánsban és a 157./1029. heterozigótában, mig az 1029. mutánsban egyetlen esetben sem találtunk rendellenesen fejlődött halterát /4. táblázat/. E különbség magyarázatára a következőket kell figyelembe venni: a haltera rendellenesség gyakorisága a 157. mutánsoknál és a 157./1029. heterozigótáknál nem haladja meg a 30%-ot, tehát a sejthalál többségét regeneráció követi. Ezt figyelembe véve az 1029. mutánsban a sejtek pusztulását követő regeneráció a 157. mutáns folyamatától sem idegen. Ezen tulmenően a megjelenésben tapasztalt különbség magyarázatául szolgálhat az is, hogy a haltera rendellenesség kiváltására a leghatékonyabb hőpulzus a 48-96 óra közötti, viszont az 1029. mutáns kelési aránya 24 óránál hosszabb pulzusokat követően meglehetősen alacsony. Igy annak lehetősége sem kizárt, hogy a haltera rendellenességét hordozó legyek a különböző szövetek fokozottabb hőérzékenysége következtében nem kelnek ki.

A 157., 1029 mutánsok és a 157./1029. heterozigóták valamennyi imágó korongjában fokozott sejtpusztulást tapasztaltunk a hőpulzus után /4. táblázat, 12. ábra/. Az adult strukturákban kis gyakorisággal az említett rendellenességeken kivül előfordult szárny, láb, antenna deficiencia vagy duplikáció /4. táblázat/. E szervek diszkuszaiban tehát a sejtelhalást legtöbbször regeneráció követi. A különböző imágó korongok közül a legnagyobb mértékü sejtelhalást a szem-antenna diszkusz mutatta, igy érthető, hogy a szem rendellenessége volt a legnagyobb arányban jelentkező abnormalitás.

A 157., 1029. mutánsok és a 157./1029. heterozigóta szem diszkuszában a fokozott sejtpusztulás a korong jól körülirt területén jelentkezett: az antenna diszkusszal kapcsolódó részén, valamint a korong szélén két helyen /13. ábra/. E törzsekben a hőpulzus után az adult szemének deficienciáját általában a horizontális középrészen találtuk, elölről és/vagy hátulról indult ki, s a szem vertikális középvonalát nem lépte át. Ezek alapján az adult szem e területei az imágó korong említett, fokozott sejtpusztulást mutató részeiből alakulnak ki.

A másik leggyakrabban rendellenességet mutató szerv, a haltera esetén nem tudjuk meghatározni, hogy

az imágó korong elpusztult területeiből az adult szerv mely része fejlődik, mivel a haltera fokozott sejtpusztulása elszórtan, foltokban található /12. ábra/, valamint a haltera deficiencia minden esetben a haltera teljes hiányát jelentette. A haltera korong foltokban jelentkező fokozott sejtpusztulása valószinüleg az ép területek normális fejlődését is gátolja, s ennek eredménye az adult haltera teljes hiánya.

Ö S S Z E F O G L A L Á S

A mutációk kiváltására EMS-el egymillió X kromoszómát kezeltünk. A ts letálisokat hőpulzussal szelektáltuk. A sta-bilnak mutatkozó, mintegy 50 mutáns komplementációs analizise során 2-2 azonos gént érintő mutációt /157. és 1029., illetve 844. és 451. izolálási számu/ találtunk. Ezek gynander teszttel vizsgálva autonóm sejt-letálisoknak bizonyultak.

A mutációk helyzetét az X kromoszómán marker mutációkkal és deficienciákkal határoztuk meg. Kísérleteink alapján a 157. és az 1029. mutáció a 23.8 ± 0.6 helyre térképeződik; a 844. és 451. mutáció helye pedig a 20A-tól a 20F régió lehet.

Az allél mutációkat hordozó törzsek LP-a a monofázikus embrió-első stádiumos lárva "határ letális" 157. és 1029. mutánsok esetében egyezett, míg a 844. és 451. mutánsok di-, illetve polifázikus LP-a csak részben esett azonos fejlődési stádiumra. Ezen eltérés legvalószinübb magyarázata a különböző genetikai háttér befolyása. Az azonos komplementációs csoportba tartozó mutánsok heterozigótájának LP-a a szülőkéhez hasonló volt.

Mutánsaink TSP-a több fejlődési stádiumon folyamatosan huzódott keresztül. Az ugyanazon

komplementációs csoporthoz tartozó mutánsok, valamint ezek heterozigótájának TSP-a egyezett. Mindkét komplementációs csoport TSP-a az embrió állapotban kezdődött és a bábozódást követően ért véget. Mivel az evagináció a bábozódás alatt: a pupáriumképzés és a pupális vedlés közötti 12 órában lezajlik, igy a már evaginált szerv a restriktiv hőmérsékletre érzéketlennek tünik. Ezek alapján mutánsaink valószinüleg olyan enzimben vagy strukturfehérjében hibásak, melyre az evagináció után már nincs szükség.

Mivel mutánsaink sejt-letálisak, igy megfelelő hőpulzust fejlődő állatnak adva, fokozott sejtpusztulást tudtunk előidézni az egyik komplementációs csoport /157. és 1029. mutánsok/ valamennyi imágó korongjában. A másik komplementációs csoport /844. és 451. mutánsok/ imágó korongjaiban csak elvétve találtunk eltérő sejthalál mintázatot a hőpulzus után. Ezt a sejthalál bekövetkezésének lassuságával magyarázhatjuk: a megölt sejtek viszonylag gyors pótlása feltételezhetően biztositja az imágó korong fejlődési folytonosságát. Elképzelhető azonban az is, hogy a restriktiv hőmérsékletnek kitett fejlődő állatok halálának oka nem az imágó korongok, hanem valamelyik belső szövet hőérzékenysége. A ritkán előforduló abnormális sejthalál mintázatnak megfelelően

csak elvétve találtunk az adult szervekben rendellenességet, mely minden esetben deficiencia volt.

Az imágó korongok sejtjeinek nagyobb mértékü pusztulását az esetek egy részében regeneráció követte, máskor azonban a belőle fejlődő adult szerv deficienciáját és/vagy duplikációját tapasztaltuk. Egyes szervek csak deficienciát /pl. 157., 1029. mutánsok és 157./1029. heterozigóta szeme/, mások deficiencia mellett duplikációt is /157., 1029. mutánsok és 157./1029. heterozigóta halterája/ mutattak. Az azonos törzs különböző egyedeinél a fokozott sejtpusztulást mindig az imágó korongok azonos részén tapasztaltuk. Az adult szervnek ugyancsak azonos területén jelentkezett a fejlődési rendellenesség. Igy lehetőség nyilt annak meghatározására, hogy az imágó korong elpusztult területéből az adult szerv mely része fejlődik.

Megköszönöm témavezetőmnek, dr. Szidonya Jánosnak, hogy munkámat irányitotta és segitette. Köszönetem fejezem ki dr. Párducz Árpádnak a scanning fotók elkészitéséért. Köszönettel tartozom dr. Kiss Istvánnak, a Szegedi Biológiai Központ Genetikai Intézete Rovargenetikai Csoportja vezetőjének, hogy lehetővé tette számomra a kisérletek elvégzését, valamint a Rovargenetikai Csoport valamennyi munkatársának és asszisztensének a sokoldalu segitségért.

F Ü G G E L É K

1. táblázat

Gynander teszt eredménye

	22°C				29°C		
	$\frac{Binsn}{R}$ ♀	Binsn ♂	$\frac{ywl^{ts}}{R}$ ♀	w ♂	$\frac{Binsn}{R}$ ♀	Binsn ♂	$\frac{ywl^{ts}}{R}$ ♀
157	32→15 /47%/	99	41→23 /56%/	77	113→17 /15%/	275	58→0
1029	33→ 8 /24%/	102	66→49 /74%/	126	63→10 /16%/	190	26→0
451	60→23 /38%/	166	80→56 /70%/	199	84→11 /13%/	212	39→0
844	49→21 /42%/	148	56→32 /57%/	167	96→14 /14%/	254	47→0

♀:kelt egyedből hány gynander

♂:kelt egyedek száma

2. táblázat

A 157 és 1029 mutánsok térképezése cm/18.9/ ct^6/20.0/ oc/23.1/ v/33.0/ markerekkel

	157	1029
cm ct^6 oc v + + + +	1089 -	518 -
+ ct^6 oc v cm + + +	15 -	8 -
+ + oc v cm ct^6 + +	64 -	22 -
+ + + v cm ct^6 oc +	19 126	9 59
+ + oc + cm ct^6 + v	3 -	1 -
össz. egyedszám	1316	617
$R_{oc-1}{}^{ts}$	$\frac{19}{1316}=0.0144=\underline{1.44\%}$	$\frac{9}{617}=0.0146=\underline{1.46\%}$
$R_1{}^{ts}{}_{-v}$	$\frac{129}{1316}=0.0980=\underline{9.80\%}$	$\frac{60}{617}=0.0972=\underline{9.72\%}$

3. táblázat

22°C-os kontroll kelési aránya

Törzs	Adultak száma/♂ + ♀/ a peték számának %-ában
l_1 1029	40.41
l_1 157	72.49
l_2 844	71.79
l_2 451	84.05
157♀ ⊗ 1029♂ $\dagger$utód	86.59
1029♀ ⊗ 157♂ $\dagger$utód	53.27
451♀ ⊗ 844♂ $\dagger$utód	89.24
844♀ ⊗ 451♂ $\dagger$utód	76.45

18°C-os kontoll kelési aránya

1029	77.77

Az imágó korongok fokozott sejtpusztulása és a belőle fejlődő struktúrák abnormalitása közötti összefüggés

	antenna	szem	szárny	haltera	láb
157	●		●		●
1029					●
157/1029	●		●		●
844	●				●
451			●	●	●
844/451	●		●	●	●

deficiencia

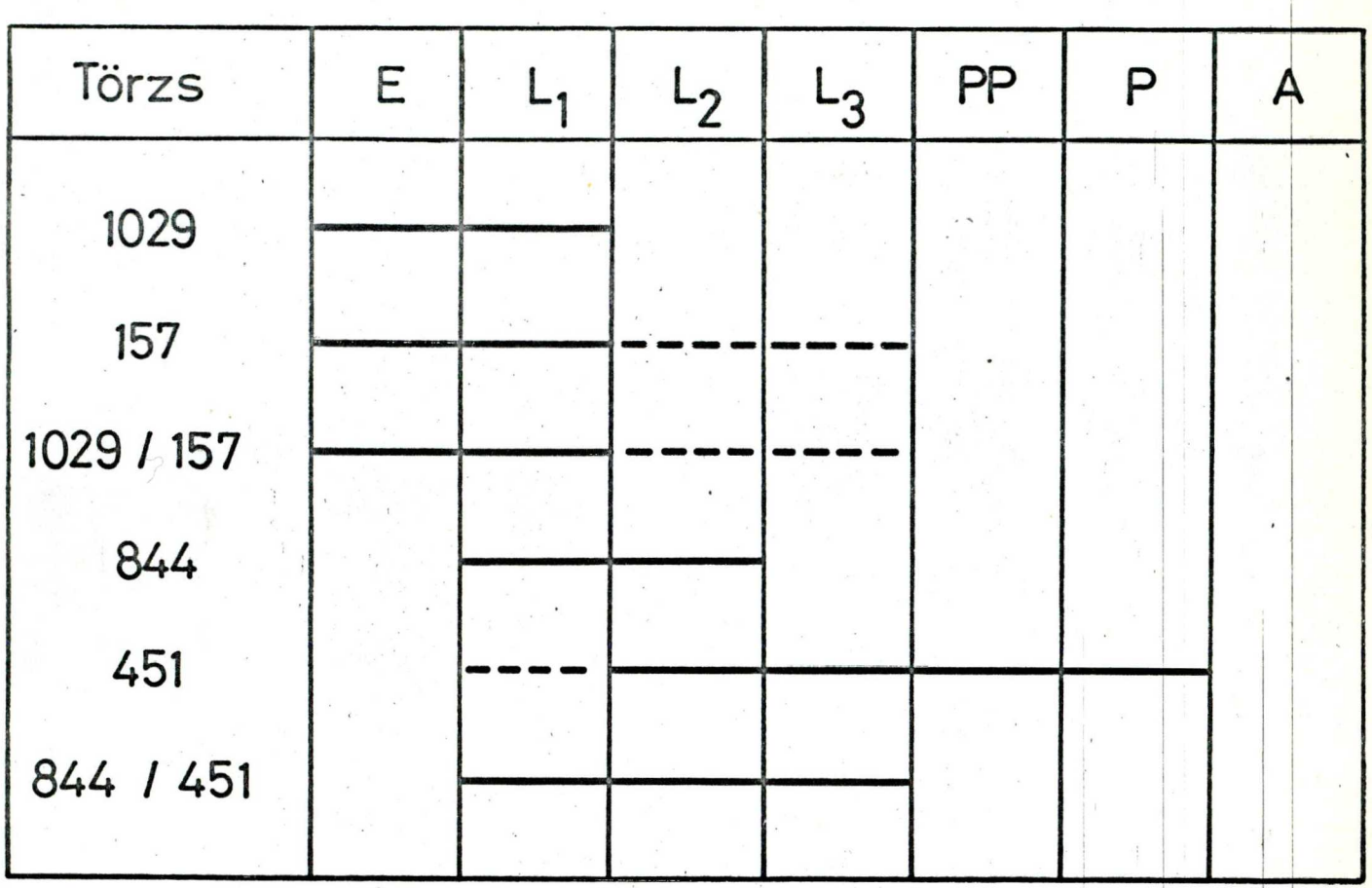
duplikáció

deficiencia olykor előfordul

fokozott sejtpusztulás

1. ábra

Letál-periódus



E: embrió

L_1, L_2, L_3: lárva stádiumok

PP: prepupa

P: pupa

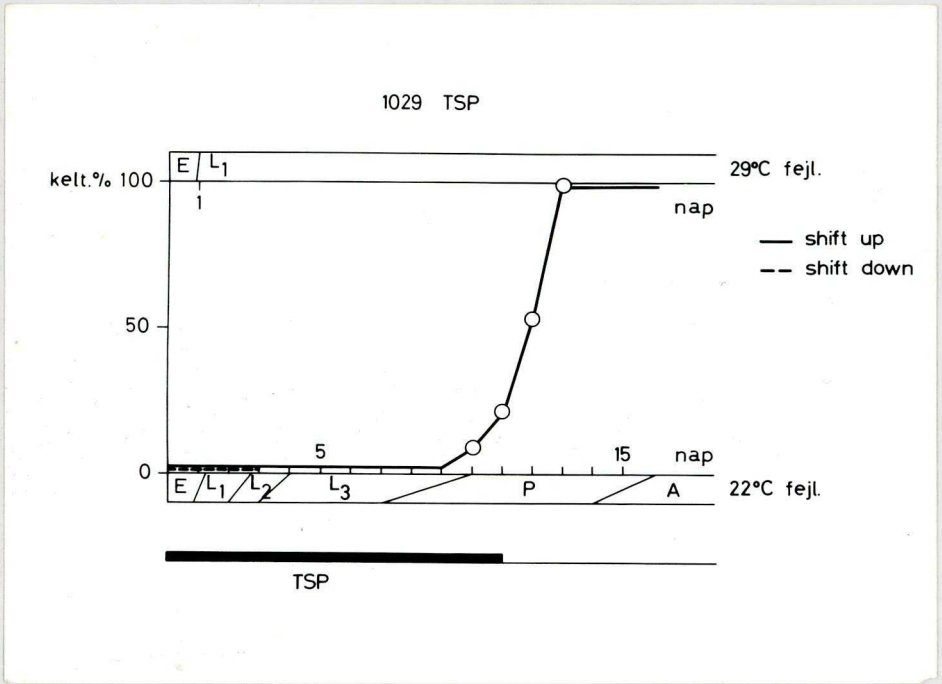
A: adult

——— letális periódus

---- 10%-nál kevesebb pusztul el

2. ábra

TSP meghatározása: 1029 mutáns



abszcissza: 22°C-os fejlődés a napok függvényében

ordináta: kelt adultak száma a peteszám %-ában, a kontroll pete-kelési %-ot figyelembe véve

abszcisszával párhuzamos felső tengely: 29°C-os fejlődés a napok függvényében

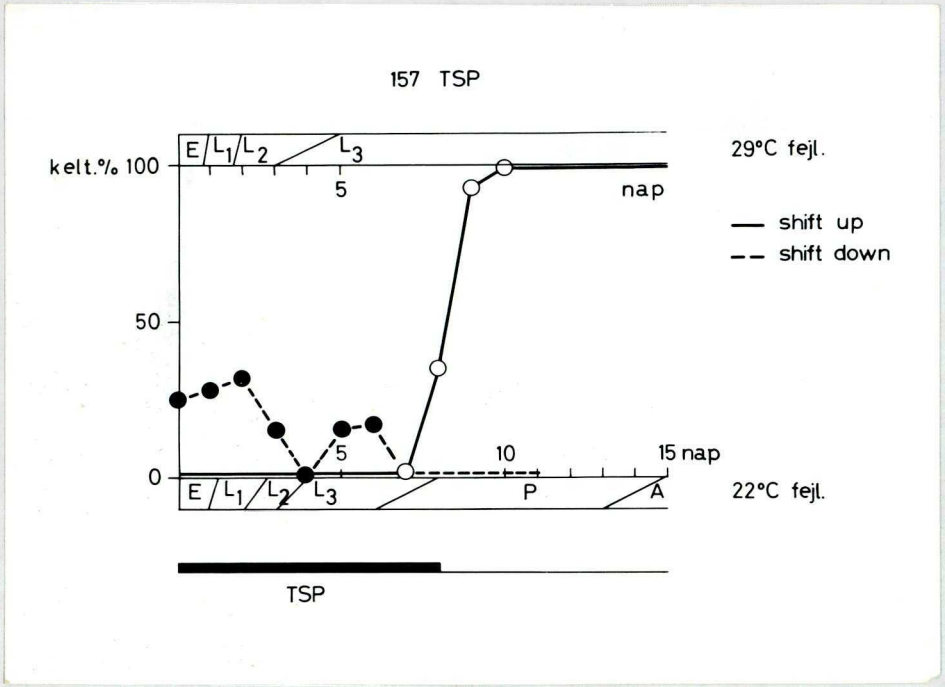
——— shift up /22°C——29°C/

- - - shift down /29°C——22°C/

vastagitott vonal: TSP ideje

3. ábra

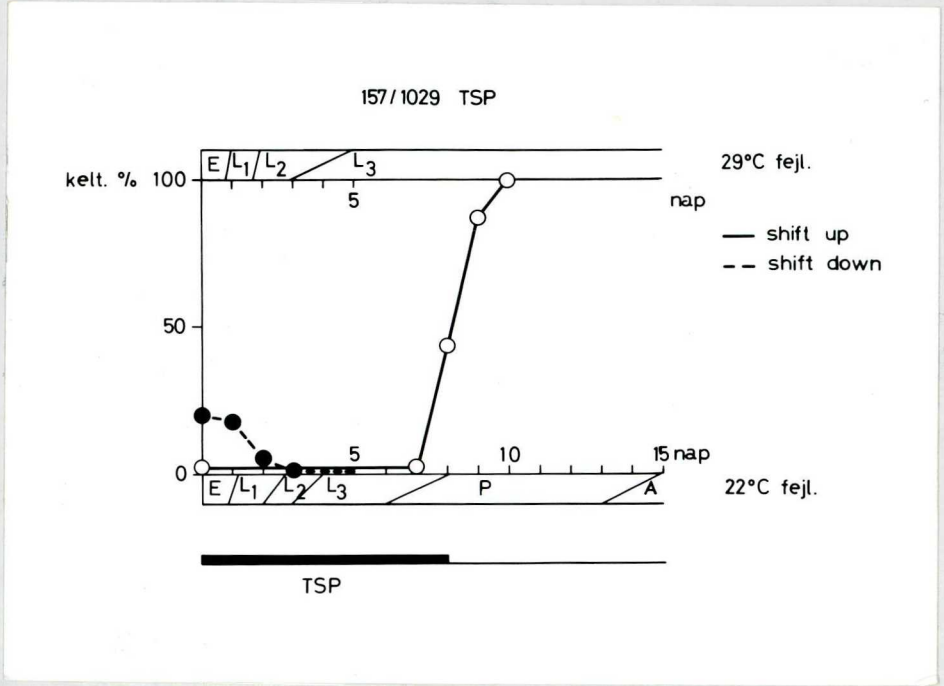
TSP meghatározása: 157 mutáns



jelöléseket ld.: 2. ábra

4. ábra

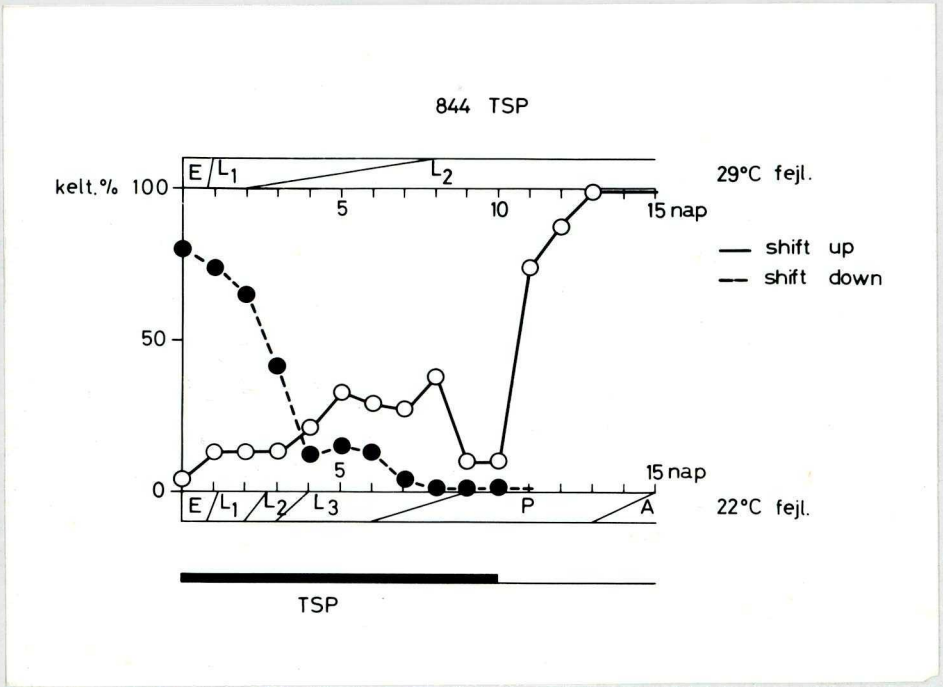
TSP meghatározása: 157/1029 mutáns heterozigóta



jelöléseket ld.: 2. ábra

5. ábra

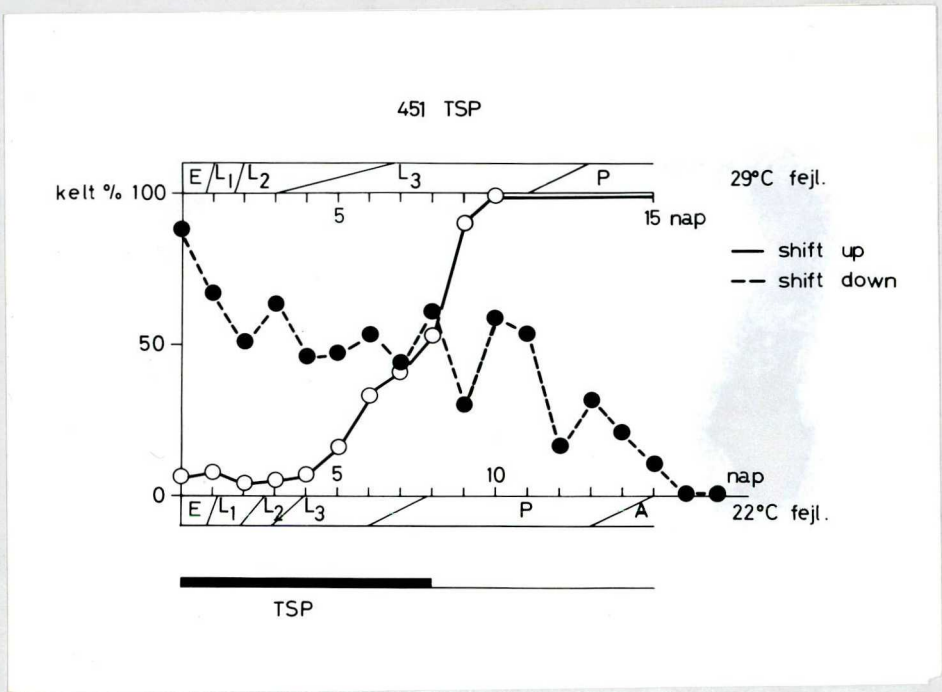
TSP meghatározása: 844 mutáns



jelöléseket ld.: 2. ábra

6. ábra

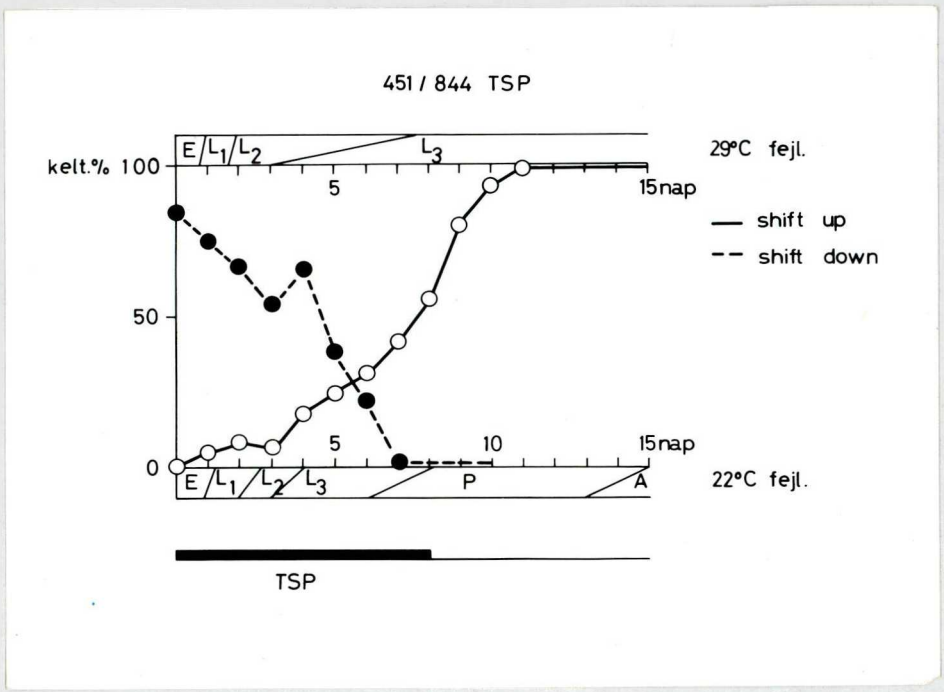
TSP meghatározása: 451 mutáns



jelöléseket ld.: 2. ábra

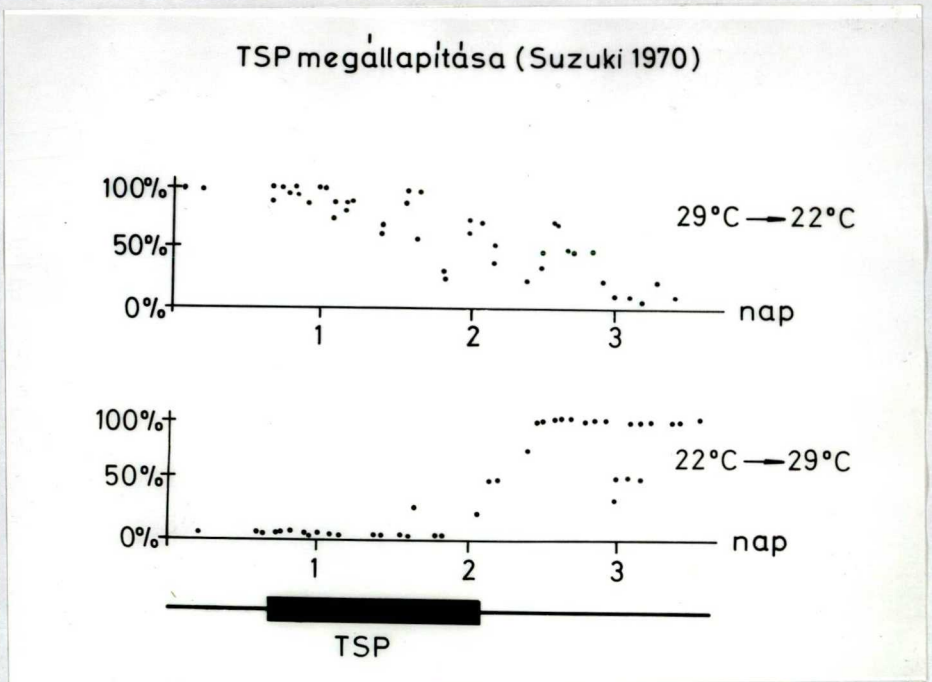
7. ábra

TSP meghatározása: 844/451 mutáns heterozigóta



jelöléseket ld.: 2. ábra

8. ábra

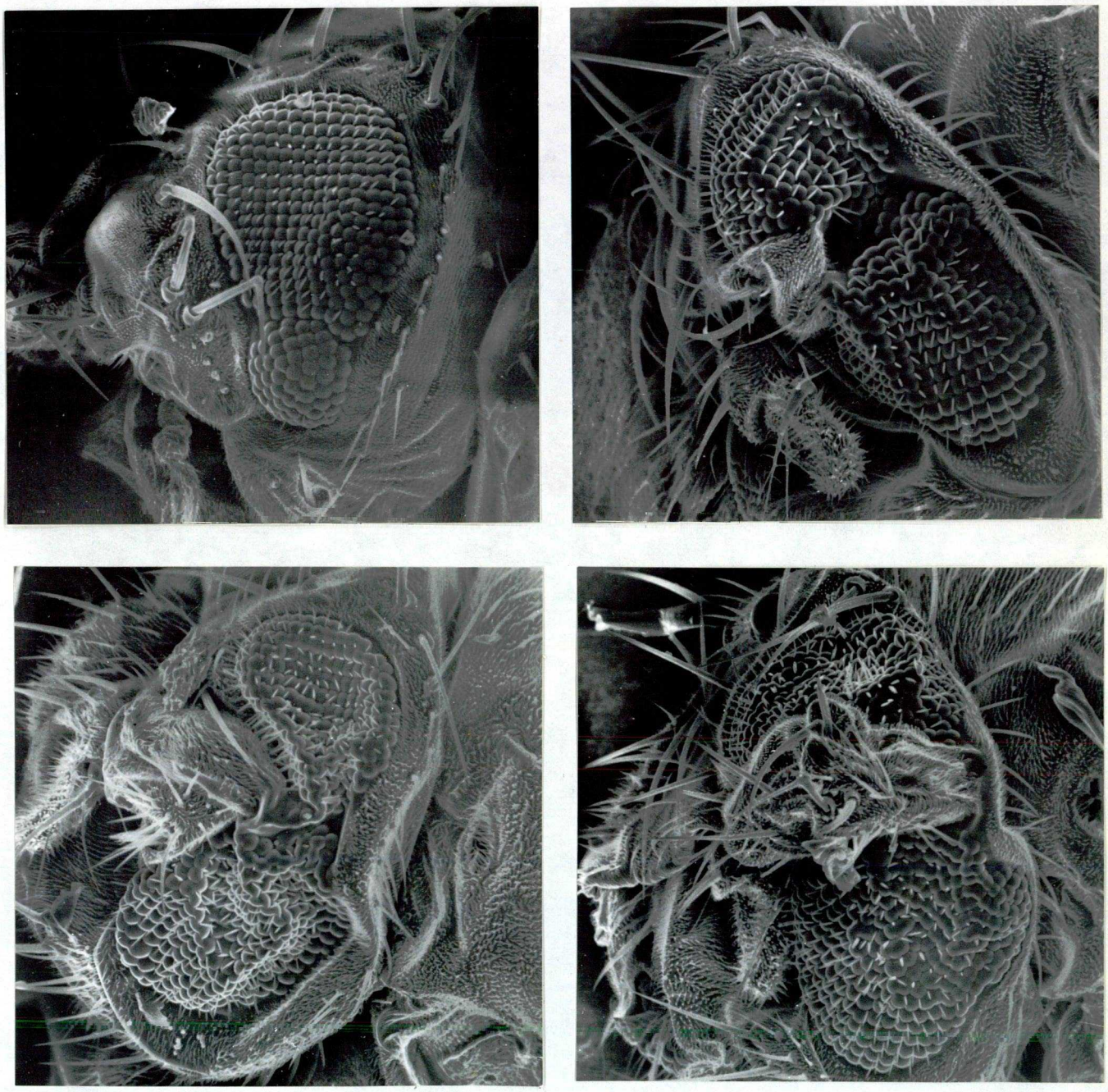


felső ábra: shift down

alsó ábra: shift up

9. ábra

A hőpulzust követően kialakult szem deficiencia

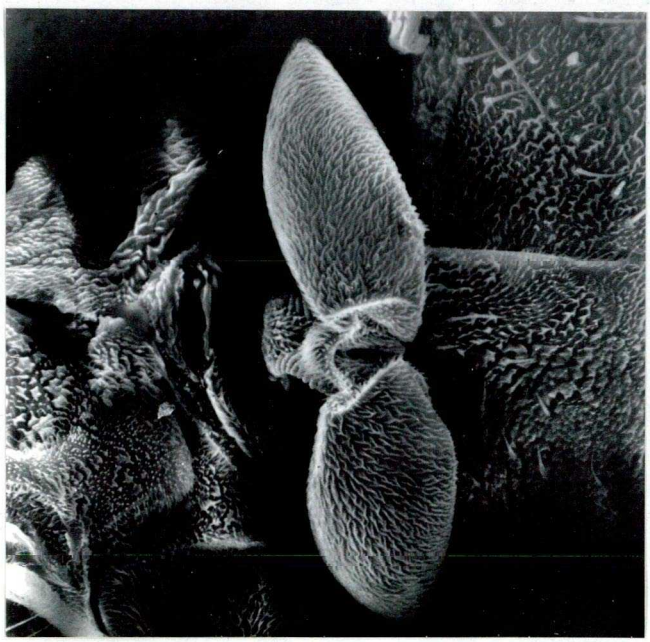


A 96-144 órás hőpulzusnak kitett 157 mutáns lárvákból fejlődő adultak deficiens szeme

SZTE

10. ábra

A hőpulzust követően kialakult haltera duplikáció



48-
A 96[redacted] órás hőpulzusnak kitett 157 mutáns lárvából fejlődő adultak duplikálódott halterája

11. ábra

Fokozott sejtpusztulás a 96-144 órás hőpulzusnak kitett 157 mutáns lárva szem-antenna diszkuszában

A./ 22°C-ontartott lárva szem-antenna diszkusza

B./ szem-antenna diszkusz a hőpulzust követően

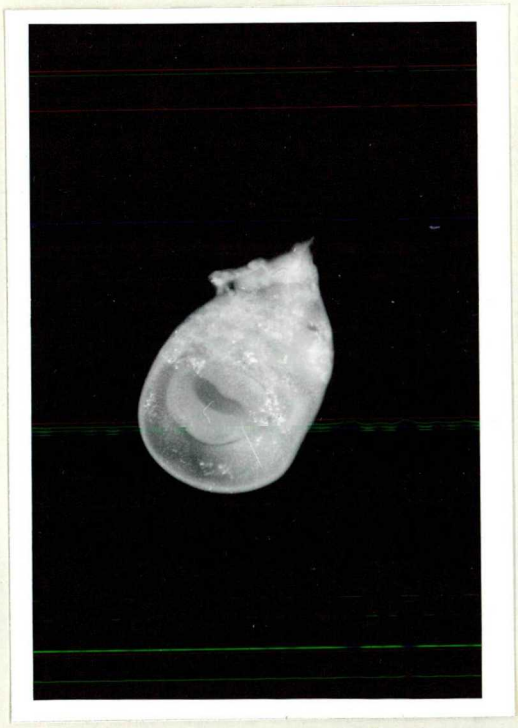
12. ábra

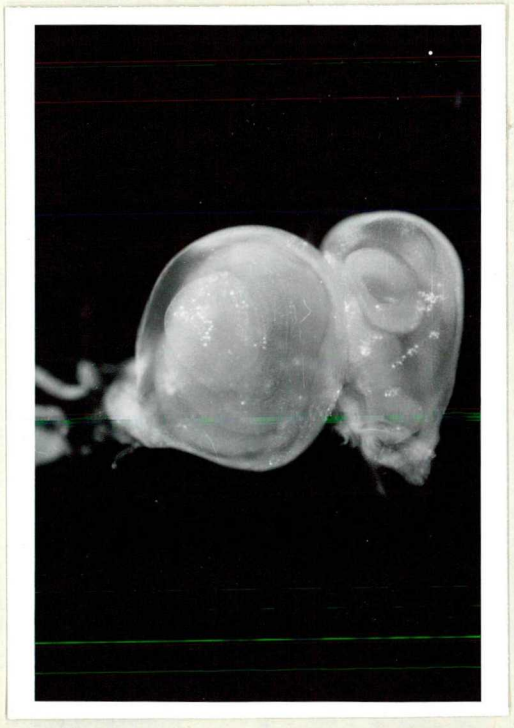
Fokozott sejtpusztulás a 96-144 órás hőpulzusnak kitett 157 mutáns lárva szárny, haltera és láb diszkuszában

22°C-on tartott lárva

szárny diszkusza

haltera és láb diszkusza





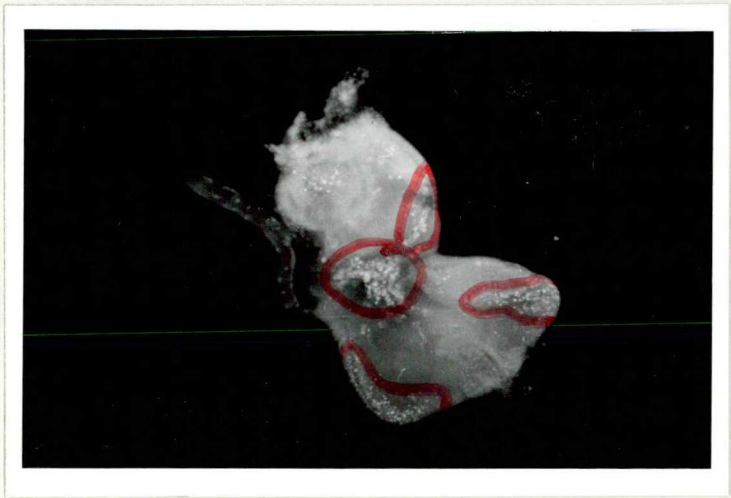
a hőpulzust követően

a szárny diszkusz

a haltera és láb diszkusz

13. ábra

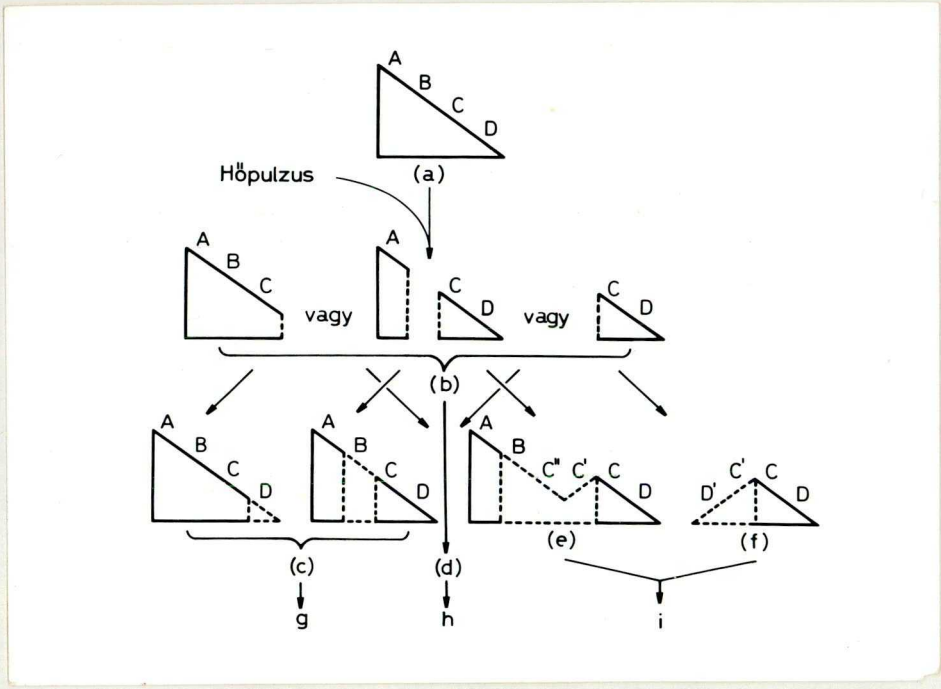
A szem-antenna diszkuszban a sejtpusztulás lokalizált



157 mutáns lárva szem-antenna diszkusza 96-144 órás hőpulzust követően

14. ábra

A hő-indukált sejthalált követő lehetséges fejlődési irányok /Bryant/



/a/: imágó korong a hőpulzus előtt

/b/: a hőpulzus következtében az imágó korong sejtjeinek egy része elpusztul

/c/: a hiányzó részek regenerálódnak

/d/: a hiány megmarad

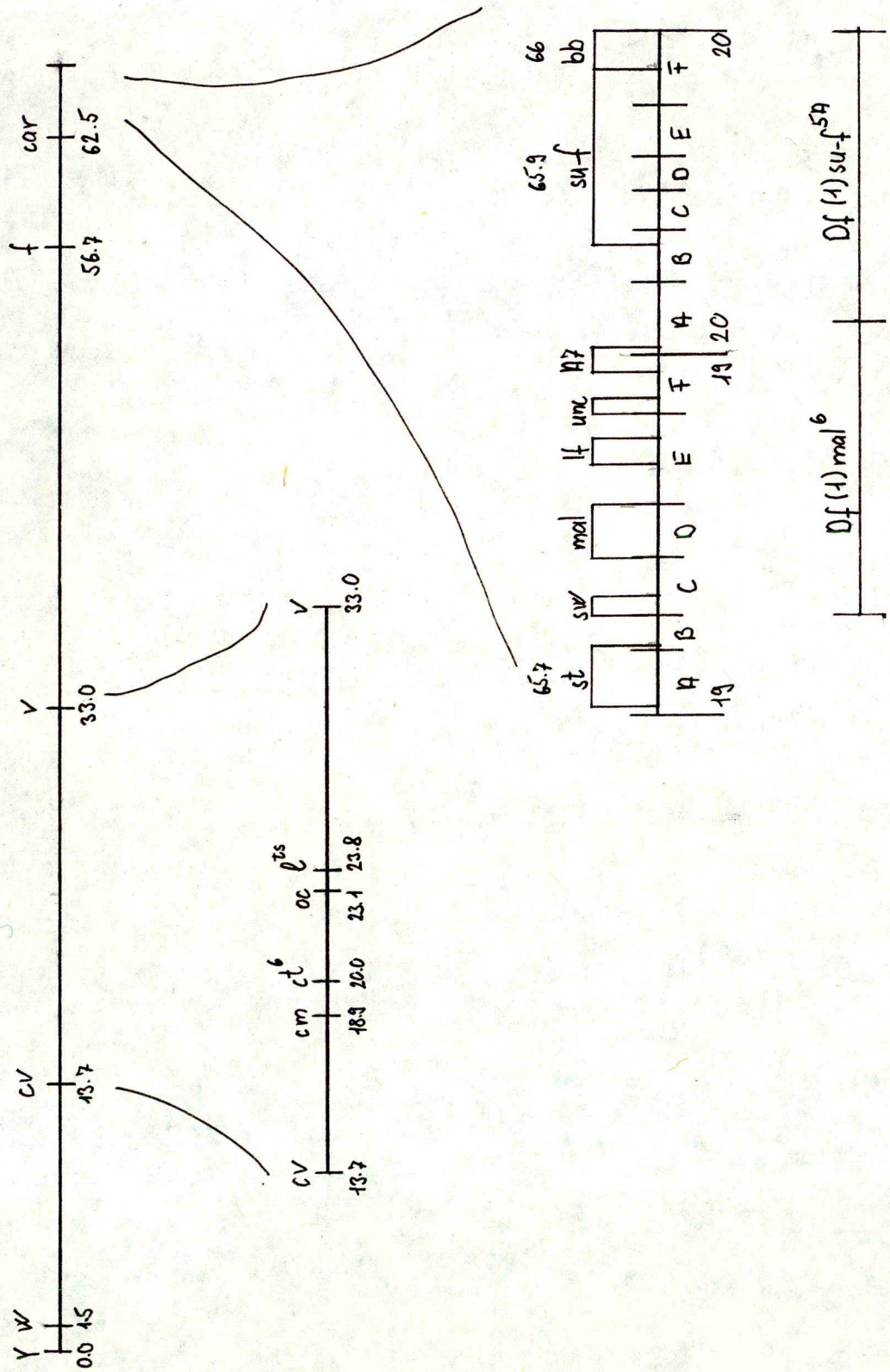
/e/: az épen maradt rész a hiányt triplikációval pótolja

/f/: az épen maradt rész a hiányt duplikációval pótolja

g, h, i: a diszkuszokból fejlődő adult szervek

15. ábra

A mutációk térképhelyzete



I R O D A L O M J E G Y Z É K

ARKING, R. /1973/.
Developmental effects of temperature-sensitive cell lethals.
Genetics 74: 9 /Abstr./

ARKING, R. /1975/.
Temperature-sensitive cell-lethal mutants of Drosophila. Isolation and characterization.
Genetics 80: 519-537.

AYLES, B.G., SANDERS, T.G., KIEFER, B.E., SUZUKI, D.T. /1973/.
Temperature-sensitive mutations in Drosophila melanogaster. XI. Male sterile mutants of the Y chromosome.
Develop. Biol. 32: 239-257.

BAILLIE, D., SUZUKI, D.T., TARASOFF, Mary /1968/.
Temperature-sensitive mutations in Drosophila melanogaster. II. Frequency among second chromosome recessive lethals, induced by ethylmethanesulphonate.
Canad. J. Genet. Cytol. 10: 412-420.

BENCZE, G. /1974/.
Az imágókorongok fejlődésében gátolt Drosophila-törzsek előállitása és előzetes elemzése.
Doktori értekezés, JATE, Szeged.

BODENSTEIN, D. /1941/.
J. exp. Zool. 87: 31-53.
Cit. Gehring, Nöthiger, 1973.

BODENSTEIN, D. /1950/.
The postembryonic development of Drosophila.
In: "Biology of Drosophila" /Ed. by DEMEREC, 632 p. John Wiley and Sons Inc., London, Chapman and Hall Ltd./ pp. 275-367.

BORST, D.W., O'CONNOR, J.D. /1972/.
Arthropod molting hormone: radioimmune assay.
Science 178: 418-419.

BRYANT, P.J. /1971/.
Regenration and duplikation following operations in situ on the imaginal discs of Drosophila melanogaster.
Devl. Biol. 26: 637-651.

BRYANT, P.J. /1974/.
Determination and pattern formation in the imaginal discs of Drosophila.
Current Topics in Developmental Biology 8: 41-80.

CARLSON, E.A., SEDEROFF, R., COGAN, M. /1967/.
Evidence favoring a frame-shift mechanism for ICR-170 induced mutations in Drosophila melanogaster.
Genetics 55: 295-313.

CASSADA, R.C. /1972/.
Termosensitive mutants of Caenorhabditis elegans.
Caltech Biol. Annual Report 81: 24-25.

CHAN, L.N., GEHRING, W. /1971/.
Determination of the blastoderm cells in Drosophila melanogaster.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68: 2217-2221.

COLLIER, J.R. /1966/.
The transcription of genetic information in the spiralian embryo.
Current Topics in Developmental Biology 1: 39-59.

DEMEREC, M. /1950/. ed.
"Biology of Drosophila".
John Wiley and Sons Inc., London, Chapman and Hall Ltd. pp. 632.

DICKINSON, W.J., SULLIVAN, D.T. /1975/.
"Gene-enzyme systems in Drosophila."
Vol. 6. of the "Results and Problems in Cell Differentiations" series /ed. by W. Beermann, J. Reinert and H. Ursprung/ /pp. 1-160/.
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1975 /160 p./.

EDGAR, R.S., DENHARDT, G.H., EPSTEIN, R.H. /1964/.
A comparative genetic study of conditional lethal mutations of bacteriophage T4D.
Genetics 49: 635-648.

EDGAR, R.S., LIELAUSIS, I. /1964/.
Temperature-sensitive mutations in T4D: their isolation and genetic characterization.
Genetics 49: 649-662.

EPOSITO, M.S., EPOSITO, R.E. /1969/.
The genetic control of sporulatior yeast. I.
Genetics 61: 78-89.

EPSTEIN, R.H., BOLLE, A., STEINBERG, C.M., KELLENBERGER, E., BOY DE LA TOUR, E., CHEVALLEY, R., EDGAR, R.S., SUSMAN, M., DENHARDT, G.H., LIELAUSIS, A. /1963/.
Physiological studies on conditional lethal mutants of bacteriophage T4D.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 28: 375-394.

EVANS, W.E., PARRY, J.M. /1974/.
Isolation, genetics and survival characteristics of thermo-sensitive mutants of yeast.
Molec. Gen. Genet. 134: 333-344.

FOX, D.J., ABACHERLI, Erika, URSPRUNG, H. /1971/.
Drosophila enzime-genetics: a table.
Experientia 27: 218-220.

FRAENKEL-CONRAT, H., WILLIAMS, R.C. /1955/.
Reconstitution of active tobacco mosaic virus from its inactiveprotein and nucleic acid components.
Proc. Nat. Acad. Sci. 41: 690-698.

FRISTROM, D. /1968/.
Cellular degeneration in wing development of the mutant vestigial of Drosophila melanogaster.
J. Cell. Biol. 39: 488-491.

FRISTROM, D. /1969/.
Cellular degeneration in the production of some mutant phenotypes in Drosophila melanogaster.
Molec. Gen. Genetics 103: 363-379.

FRISTROM, J. W. /1970/.
The developmental biology of Drosophila.
Ann. Rev. Genetics 4: 325-346.

FRISTROM, J.W. /1972/.
The biochemistry of imaginal disk development.
In "The Biology of Imaginal Discs"./H. Ursprung and R. Nöthiger ed./ Results and Problems in Cell Differentiation. Vol.5. pp. 109-154.
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York.

FRISTROM, D. /1972/.
Chemical modification of cell death in the Bar eye of Drosophila.
Molec. Gen. Genetics 115: 10-18.

FRISTROM, J.W., LOGAN, W.R., MURPHY, C. /1973/.
The synthetic and minimal culture requirements for evagination of imaginal discs of Drosophila melanogaster in vitro.
Devl. Biol. 33: 441-456.

FRISTROM, J.W., YUND, Mary Alice /1973/.
Genetic programming for development in Drosophila.
CRC Critical Reviews in Biochemistry pp. 537-570 /1973 September/.

GARCIA-BELLIDO, A. /1972/.
Pattern formation in imaginal Disks. In "The Biologi of Imaginal Discs". /H. Ursprung and R. Nöthiger ed./
Results and Problems in Cell Differentiation. Vol. 5. pp. 59-91. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York.

GEHRING, W.J., NÖTHIGER, R. /1973/.
The imaginal discs of Drosophila.
In: "Developmental Systems: Insects" /S. J. Counce and C. H. Waddington ed./
Vol. 2. pp. 211-290. Acad. Press London and New York.

GRIGLIATTI, T.A., SUZUKI, D.T. /1971/.
Temperature-sensitive mutants in Drosophila melanogaster. VIII. The homeotic mutant $ss^{a}40^{a}$.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68: 1307-1311.

GRIGLIATTI, T.A., SUZUKI, D.T., WILLIAMSON, R. /1972/.
Temperature-sensitive mutations in Drosophila melanogaster. X. Developmental analysis of the paralytic mutation $para^{ts}$.
Develop. Biol. 28: 352-371.

HADORN, E. /1951/.
Adv. Genet. 4: 53-85.
Cit. Shannon, M.P. és mtsai, 1972. "Genetics" 72: 615-638.

HADORN, E. /1948/.
Symp. Soc. Exptl. Biol. Cambridge 2: 177-195.
Cit. Shannon, M.P. és mtsai, 1972. "Genetics" 72: 615-638.

HALL, Linda /1974/.
Conditional dominance of temperature-sensitive locomotive-mutants.
Drosophila Information Service 50: 103-104.

HINTON, C.W. /1955/.
The behaviour of an unstable ring chromosome of Drosophila melanogaster.
Genetics 40: 951-961.

HIRSCH, D., VANDERSLICE, Rebecca /1976/.
Temperature-sensitive developmental mutants of Caenorhabditis elegans.
Develop. Biol. 49: 220-235.

HOGE, M.H. /1915/.
J. Exp. Zool. 18: 241-297.
Cit. Suzuki és mtsai 1973.

HOLDEN, Jeanette, SUZUKI, D.T. /1973/.
Temperature-sensitive mutants in Drosophila melanogaster. XII. The genetic and developmental characteristics of dominant lethals on chromosome 3.
Genetics 73: 445-458.

HOROWITZ, N.H., FLING, M. /1953/.
Genetic determination of thyrosinase termostability in Neurospora.
Genetics 38: 360-374.

HOROWITZ, N.H., LEUPOLD, U. /1951/.
Cit. Stent, G.S. 1971. "Molecular Genetics", pp. 133-135, 336.

HOTTA, Y., STERN, H. /1963/.
Molecular events of mitotic regulation.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 49: 648-654.

IGARASHI, S. /1966/.
Mutation Research 3: 13-24.
Cit. Suzuki és mtsai, 1967. "Proc. Nat. Acad. Sci. USA" 57: 907-912.

INOUYE, S., TAKAYA, H. /1964/.
Japan. J. Genet. 38: 28-36.
Cit. Arking, R. 1975. "Genetics" 80: 519-537.

JOCKUSCH, H. /1966/.
Relations between temperature-sensitivity amino acid replacements, and quaternery structure of mutant proteins.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 24: 577-583.

JUDD, B.H., SHEN, M.W., KAUFMAN, T.C. /1972/.
The anatomy and function of a segment of the X chromosome of Drosophila melanogaster.
Genetics 71: 139-156.

KAUFMAN, T.C., SUZUKI, D.T. /1974/.
Temperature-sensitive mutations in Drosophila melanogaster. XX. Lethality due to translocation.
Canad. J. Genet. Cytol. 16: 579-592.

KISS, I., BENCZE, G., FEKETE, Éva, FODOR, A., GAUSZ, J., MARÓY, P., SZABAD, J., SZIDONYA, J. /1976/.
Isolation and characterization of X-linked lethal mutants affecting differentiation of the imaginal discs in Drosophila melanogaster.
Theor. Appl. Genet. 48: 217-226.

KOMAI, T. /1926/.
Genetics 11: 280-293.
Cit. Arking, R. 1975. "Genetics" 80: 519-537.

KRIEG, D.R. /1963/.
Ethylmethanesulfonate-induced reversion of bacteriophage. T4rII mutants.
Genetics 48: 561-580.

LANGRIDGE, J. /1965/.
Australian J. Biol. Scr. 18: 311-321.
Cit. Suzuki és mtsai 1967. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 57: 907-912.

LEWIS, E., BACHER, F. /1968/.
Method of feeding ethyl methane sulfonate /EMS/ to Drosophila males.
Drosophila Information Service 43: 193.

LINDSLEY, D.L., GRELL, E.H. /1968/.
"Genetic variation in Drosophila melanogaster."
Carnegie Institution Wash. Publ. 627.

MARÓY, P., VARGHA, J., HORVÁTH, K. /1977/.
Rapid heterologous haptene radioimmunoassay for insect moulting hormone.
FEBS Lett. 81: 319-322.

MARÓY, P., TARNÓY, K. /1978/.
Moulting hormone level during the last instar of Galleria mellonella larva.
J. Insect Physiol. 24: 325-327.

McDONALD, I.C., OVERLAND, D.E. /1972/.
Temperature-sensitive mutations in the housefly: The characterization of heat sensitive recessive lethal factors on autosome III.
J. Econ. Entomol. 65: 1364-1368.

MULLER, H.J. /1954/.
Cit. Faludi B. 1965. Örökléstan, Tankönyv-kiadó, Budapest.

NEURATH, H. /1957/.
The activation of zymogens.
Advanc. Protein Chem. 12: 319-386.

NISHIMARA, M., RUMING, W.R. /1964/.
J. Bacteriol. 88: 1220-1229.
Cit. Suzuki és mtsai 1967. "Proc. Nat. Acad. Sci." 57: 907-912.

NÖTHIGER, R. /1972/.
The larval development of imaginal disks.
In: "The Biologi of Imaginal Disks". /H. Ursprung and R. Nöthiger ed./ Results and Problems in Cell Differentiation. Vol. 5. pp. 1-34. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York.

NÖTHIGER, R., SCHUBIGER, G. /1966/.
Developmental behavior of fragments of symmetrical and asymmetrical imaginal discs of Drosophila melanogaster /Diptera/.
J. Embriol. exp. Morph. 16: 355-368.

OROSZ, L.
Kandidátusi értekezés. 1972.

OSTER, I.I. /1954/.
Time of death of sex-linked lethals of different origins in Drosophila melanogaster.
Nature 173: 594-595.

POODRY, C., HALL, Linda, SUZUKI, D.T. /1973/.
Developmental properties of shibire^{ts1}, a pleiotropic mutation producing larval and adult paralysis.
Develop. Biol. 32: 373-386.

POSTLETHWAIT, J.H. /1975/.
Pattern formation in the wing and haltere imaginal discs after irradiation of Drosophila melanogaster first instar larvae.
Wilhelm Roux•Archiv 178: 29-50.

POSTLETHWAIT, J.H., SCHNEIDERMAN, H.H. /1973/.
Pattern formation in imaginal discs of Drosophila melanogaster after irradiation of embryos and young larvae.
Develop. Biol. 32: 345-360.

POULSON, D.F. /1950/.
Histogenesis, organogenesis and differentiation in the embryo of Drosophila melanogaster Meigen. /Ed. by M. DEMEREC, 632 p. John Wiley and Sons Inc., London, Chapman and Hall Ltd./, pp.168-274.

ROBB, J.A. /1969/.
Maintenance of imaginal discs of Drosophila melanogaster in chemically defined media.
J. Cell. Biol. 41: 876-884.

ROSENBLUTH, R., EZELL, D., SUZUKI, D.T. /1972/.
Temperature-sensitive mutations in Drosophila melanogaster. IX. Dominant cold-sensitive lethals on the autosomes.
Genetics 70: 75-86.

RUSSEL, M.A. /1974/.
Pattern formation in the imaginal disc of a temperature sensitive cell-lethal mutant of Drosophila melanogaster.
Develop. Biol. 40: 24-39.

SANDERS, A., AYLES, B. /1970/.
Temperature-sensitive male steril mutations of the Y chromosome of Drosophila melanogaster.
Canad. J. Genet. Cytol. 12: 394. /Abstr./.

SANG, J.H., BURNET, B. /1963/.
Environmental modification of the eyeless phenotype in Drosophila melanogaster.
Genetics 48: 1683-1699.

SCHALET, A. /1972/.
Drosophila Inform. Serv. 49: 36-37.

SCHUBIGER, G. /1971/.
Regeneration, duplication and transdetermination in fragments of the leg disc of Drosophila melanogaster.
Develop. Biol. 26: 277-295.

SCHWARTZ, D. /1958/.
J. Hered. 49: 149-152.
Cit. Suzuki és mtsai, 1973.

SCHWINK, I. /1961/.
Quantitative studies on the temperature dependence of drosopterin formation and of semilethality in the mutant rosy of Drosophila melanogaster.
Genetics 46: 896-897.

SHANNON, M.P., KAUFMAN, T.C., SHEN, M.W., JUDD, B.H. /1972/.
Lethality patterns and morphology of selected lethal and semilethal mutations in the zeste-white region of Drosophila melanogaster.
Genetics 72: 615-638.

SHEARN, A., GAREN, A. /1974/.
Genetic control of imaginal disc development in Drosophila.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 71: 1393-1397.

SHEARN, A., RICE, T., GAREN, A., GEHRING, W. /1971/.
Imaginal disc abnormalities in lethal mutants of Drosophila.
Proc.Nat. Acad. Sci. USA, 68: 2594-2598.

SONNENBLICK, B; P. /1950/.
The early embryology of Drosophila melanogaster.
In: "Biology of Drosophila".
/M. DEMEREC ed. 632 p., John Wiley and Sons Inc. London, Chapman and Hall Ltd./ pp.62-167.

SPIRIN, A.S. /1966/.
On "masked" forms of m-RNA in early embryogenesis and other differentiation forms.
Curr. Top. Develop. Biol. 1: 1-38.

SPREIJ, T.H. /1971/.
Cell death during the development of the imaginal disks of Calliphora Erythrocephala.
Neth. J. Zool. 21: 221-264.

József Attila Tudományegyetem Könyvtára SZEGED

STENT, G.S. /1971/.
"Molecular Genetics"
/651 p., W.H. Freeman and Co., San Francisco, USA/. pp. 17-29, 121-135, 140-143, 144-152, 336-341, 362-391, 575-576.

SUZUKI, D.T. /1970/.
Temperature-sensitive mutations in Drosophila melanogaster.
Science 170: 695-706.

SUZUKI, D.T. /1974/.
Behaviour in Drosophila melanogaster: A geneticist's review.
Canad. J. Genet. Cytol. 16: 713-735.

SUZUKI, D.T., DUCK, P. /1967/.
Localization of genetic positions and sensitive periods of temperature-sensitive lethal mutations in Drosophila.
Genetics 56: 592. /Abstr./.

SUZUKI, D.T., KAUFMAN, T.C., FALK, D., HALL, L., FITZ-EARLE, M., CAMFIELD, R., SCHEWE, M.J., POODRY, C., TASAKA, E.S., JUNKER, A.K., GRIGLIATTI, T., MACAULAY, S. /1973/.
Conditionally-expressed mutations in Drosophila melanogaster.
/Kézira t/.

SUZUKI, D.T., PITERNICK, L.K., HAYASHI, S., TARASOFF, Mary, BAILLIE, D., ERASMUS, U. /1967/.
Temperature-sensitive mutations in Drosophila melanogaster. I. Relative frequences among gamma-ray and chemically induced sex-linked recessive lethals and semilethals.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 57: 907-912.

SUZUKI, D.T., PROCUNIER, D. /1968/.
Tempera-ture-sensitive mutations in Drosophila melanogaster. III. Dominant lethals and semi-lethals on chromosome 2.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 62: 369-376.

SZIDONYA, J. /1973/.
Hőérzékeny Drosophila mutánsok vizsgálata.
Doktori értekezés, JATE, Szeged.

TARASOFF, Mary, SUZUKI, D.T. /1970/.
Temperature-sensitive mutations in Drosophila melanogaster. VI. Temperature effect on the development of sex-linked recessive lethals.
Develop. Biol. 23: 492-509.

URSPRUNG, H. /1972/.
The fine structure of imaginal discs.
In: "The Biology of Imaginal Disks."
/H. Ursprung and R. Nöthiger ed./, pp.93-106.
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York.

URSPRUNG, H., NÖTHIGER, R. /Editors/ /1972/.
"The Biology of Imaginal Discs." Vol. 5. of the "Results and Problems of Cell Differentiation" series /W. Beermann, J.Rehert and H. Ursprung eds./, pp.1-172.
Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York.

VINCZE, Éva /1976/.
Szakdolgozat.

VOGT, M. /1943/.
Biol. Zbl. 63: 395-446.
Cit. Gehring, Nöthiger, 1973.

VYSE, E.R., JAMES, A. /1972/.
Drosophila Inform. Serv. 49: 39.

WADDINGTON, C.H. /1939/.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 25: 299-307.
Cit. Arking, R. 1975. "Genetics" 80: 519-537.

WHITTEN, J.M. /1969/.
Cell death during early morphogenesis: parallels between insect lines and vertebrate limb development.
Science 163: 1456-1457.

WRIGHT, T.R.F. /1973/.
The recovery, penetrance and pleiotropy of X-linked, cold-sensitive mutants in Drosophila.
Molec. Gen. Genet. 122: 1235-1249.