

**Tudományos munkásságom tézisszerű
összefoglalása**

Szabó Piroska Edit

1996

I. A porc matrix fehérje gén működése: a promoter és a silencer azonosítása és analízise

- | | | |
|------|---|----|
| I.1. | Bevezetés | 3. |
| I.2. | A CMP és LP gének kifejeződése <i>in vitro</i> porc differenciálódás folyamán | 4. |
| I.3. | Szabályozó régiók azonosítása A CMP gén előtti DNS szakaszon | 4. |
| I.4. | A CMP gén szabályozó régióihoz transzkripciós faktorok kötődnek | 7. |

II. Genomi bevéődés jelenségének tanulmányozása emlős rendszerben

- | | | |
|-------|---|-----|
| II.1. | Bevezetés | 8. |
| II.2. | Anyai és apai bevéődésű gének kifejeződése és metiláltsága parthenogenetikus és androgenetikus embrionális őssejtek <i>in vitro</i> differenciálódása során | 9. |
| II.3. | Egér embriók sorsa, amelyek a hetedik kromoszóma bevéődött régiójából két apai eredetűt hordoznak | 11. |
| II.4. | Anyai és apai bevéődésű gének kifejeződnek mindkét alléljukról az egér csíravonalban: az anyai és apai jelek eltörlődése generációk között | 14. |
| II.5. | Anyai és apai bevéődésű gének allél-specifikus kifejeződése és transzkripciós szintje egér embrió fejlődése folyamán | 15. |
| II.6. | Genomok közötti kölcsönhatás nem játszik szerepet az anyai vagy apai kifejeződésű gének bevéődésében | 16. |

Utószó	18.
--------	-----

Irodalomjegyzék	19.
-----------------	-----

I. A porc matrix fehérje gén működése: a promoter és a silencer azonosítása és analízise

I.1 Bevezetés

A porcszövet fontos szerepet játszik a gerincesek állatok és az ember testének felépítésében és mozgásában mint a csontrendszer előfutára, és az ízületek, valamint a csigolyák kipárnázója (1). A porcszövetet a porcsejtek és az általuk termelt sejtközzötti állomány alkotja. Ez utóbbi kétféle makromolekula, II. típusú kollegén és aggrecán egymásba szövött hálózatának köszönhetően rendkívüli rugalmassággal és szilárdsággal rendelkezik (1,2,3). A makromolekulák kettős hálózatának összetartásában kisebb, globuláris fehérjemolekuláknak, mint például a porc matrix fehérjének (CMP) és a kapcsoló fehérjének (LP) tulajdonítanak fontos szerepet (3-10).

A porc matrix fehérje (CMP) a porcszövet sejtközzötti állományának fontos alkotó molekulája (5, 8-10), amely porcsejtekben termelődik, az egyedfejlődés meghatározott stádiumában (csirke embrió végtagkezdemény esetén az 5. naptól kezdve) (11-14). Génjének működése tehát szigorúan meghatározott időben és helyen történik a szervezetben. A CMP gén transzkripciójának szabályozása egy magasabbrendű program, a végtagfejlődés, azon belül a porcos differenciálódás programjának szerves része. Ez a program nagyon bonyolult, több szinten zajló műveleteket foglal magába. Megértése sokirányú kutatást kíván, melynek egyik lehetséges kiindulópontja éppen a porcspecifikus

gének, -esetünkben a CMP gén- sajátos működésének feltárása és az abban szerepet játszó jellegzetes cisz és transz szabályozó elemek (reguláló DNS régiók és transzkripció faktorok) (15-16) keresése.

I.2. A CMP és LP gének kifejeződése *in vitro* porc differenciálódás folyamán

A porcos differenciálódás folyamatát modellező szövetkultúra sejtjeiből készült RNS felhasználásával Northern hibridizációs kísérletekben kimutattuk, hogy a CMP mRNS-e nagy mennyiségben jelen van a differenciálódott (I. és II. stádiumú) chondrocytákban, ellenben dedifferenciált sejtekben a CMP gén működése gátolt. E kísérletünk későbbi vizsgálatok alapjaként szolgált (17.) A CMP és LP gének szabályozásának közös vonásaira mutatott rá az a kísérletünk, amelyben megegyező eredményre jutottunk az LP mRNS-ének kimutatása során.

I.3. Szabályozó régiók azonosítása A CMP gén előtti DNS szakaszon

Elvégeztük a CMP gén előtti, mintegy 10 kb-nyi DNS szakasz restrikciós térképezését 4 genomiális klón analízise révén abból a célból, hogy a térkép

ismeretében ezen régió tetszőleges fragmentumainak hatását tudjuk vizsgálni a CMP gén működésére tranziens expressziós kísérletekben.

A restrikciós térkép felhasználásával CMP gén 5' régiójának *Hind*III fragmentumait szubklónoztuk a pTK-CAT expressziós vektorba, majd a plazmidkonstrukciókat szövetkultúra sejtjeibe juttatva megmértük a CAT gén aktivitását. Így kiderült, hogy a gén előtti 2.4kb-tól -10.7kb-ig terjedő szakaszt lefedő *Hind*III fragmentumok egyike sem hordoz enhancert, ugyanakkor azonban a -6.8-tól -10.7kb-ig elhelyezkedő H_A és H_B fragmentumok jelentős mértékben csökkentették az idegen (timidin kináz) promoterról működő CAT gén aktivitását porcsejtekben, míg fibroblastokban kisebb mértékben. Ez a CMP gén távoli negatív szabályozó elemeinek porcspecifikus működését mutatja (18).

A CMP gén promoter régiójában elhelyezkedő restrikciós helyek felhasználásával létrehoztunk egy plazmidsorozatot, amely a CMP gén előtti 1.2 kb hosszúságú DNS szakaszt, illetve annak különböző deléciós származékait hordozta a CAT gén előtt. Primér chondrocyta és fibroblast kultúra sejtjeibe juttattuk be a deléciósorozat tagjait, és megállapítottuk, hogy a CMP gén promoterét hordozó alapkonstrukció (pCMP-CAT-N) aktivitást mutat porcsejtekben, igen gyengén működik fibroblastokban, tehát az 1.2 kb hosszúságú régió működése szövetspecifikus (18).

A TATA motívum elé mindössze 15 bp-ral nyúló 79 bp hosszúságú DNS szakasz elégnek bizonyult a génműködés beindításához porcsejtekben, ezért ezt

a régiót (pCMP·CAT·N·(-ABC)), a CMP gén minimál promoterének tekintjük . A minimál promoter előtt egy erős negatív hatású (C), továbbá két pozitív hatású fragmentum (A és B) jelenlétét tudtuk még kimutatni a deléció-sorozat vizsgálatával (18).

Az 1.2 kb hosszúságú CMP promoter régió BAL 31 rövidítési sorozatának vizsgálatával tranziens expressziós kísérletekben a promoter részletesebb funkcionális analízisét végeztük el. Kiderült, hogy a B régió több, viszonylag gyengébb szabályozó elemet hordoz, így pozitív és negatív hatású szakaszokat egyaránt, amelyek valószínűleg együttesen fontos elemei a CMP gén porcspecifikus kifejeződésének, és a transzkripció szintjének finom beállításában játszhatnak szerepet (19).

A CMP promoter deléció-sorozatának és rövidítési sorozatának tranziens expressziós vizsgálata egyaránt rávilágított egy erős negatív hatású fragmentum jelenlétére a CMP gén minimál promotere előtti -15-től -334 bp-ig elhelyezkedő szakaszon. Kimutattuk, hogy ez a C fragmentum primér porckultúra és fibroblast tenyészet sejtjeiben silencerként viselkedik (18), hiszen mind a saját, mind idegen (TK, RSV) promoterról gátolja a génműködést távolságtól, pozíciótól és iránytól függetlenül, bár a gátlás mértéke mutat némi irányfüggőséget, ugyanis fordított irányban erősebb.

A CMP gén silencere kevésbé volt aktív nagy denzitású mesenchyma kultúra sejtjeiben, mint a primér chondrocytákban, így feltételezhető, hogy

esetleg fejlődésspecifikus kapcsolóelemként is szerepet játszik a CMP gén szabályozásában.

I.4. A CMP gén szabályozó régióihoz transzkripció faktorok kötődnek

Sejtmagi fehérjekivonatot készítettünk fibroblastokból, és *in vitro* footprint kísérletekben fehérje faktorok által védett szakaszokat találtunk a CMP gén promoter és silencer régiójában (19). Munkatársaim később bebizonyították, hogy a CMP gén silenceréhez kötődő fehérje egy NF- κ B típusú transzkripció faktor, amely a gén működését negatívan szabályozza fibroblastokban (19).

II. Genomi bevésődés jelenségének tanulmányozása emlős rendszerben

II.1. Bevezetés

Az emlősök, így az ember két fél genomja, az apai és az anyai öröklődésű kromoszóma szerelvény nem egyenértékű. Működésükkel kiegészítik egymást. Ez egyértelmű azokból a megfigyelésekből, amelyekben kísérletileg előállítottak két azonos genomot (két apait vagy két anyait) tartalmazó egér embriókat, és azok a fejlődésüknek igen korai szakaszában elpusztultak (20-23). Hasonlóképpen fejlődési problémákat írtak le olyan esetekeben is, amikor csak egy-egy autoszóma bizonyos darabja származott ugyanazon szülőtől, míg a genom többi része normális volt (24-26). Ilyen kromoszóma darabok például a hetedik és a tizenkettedik kromoszóma disztális végei (26).

Ezekre a kromoszóma szegmentekre térképeződnek olyan gének, amelyeknek csak az anyai, vagy csak az apai alléljuk működik (+/- vagy -/+). Az ilyen típusú géneket egyallélos kifejeződésű anyai (27-28) vagy apai bevésődésű (29-30) géneknek nevezzük el most, mivel magyar terminológia még nem áll rendelkezésünkre. Ilyen fajta géneknek az egyallélos helyetti -/- illetve +/+ kifejeződése lehet az oka a parthenogenetikus (PG), valamint gynogenetikus (GG) (két anyai genomot tartalmazó) és androgenetikus (AG) (két apai genomot tartalmazó) embriók korai halálának, valamint a kromoszómadarab

megkettőződéses embriókban tapasztalt fejlődési rendellenességeknek, illetve embrionális halálnak.

Az anyai, illetve apai genomi bevéődés mechanizmusa még nem ismert. Mivel a genomi bevéődés apai vagy anyai volta relatív, csak egy generációra érvényes, a bevéődés mechanizmusa nem lehet egy stabil jel a DNS szekvenciájában, hanem valami más (epigenetikus) jel, ami hatással van a génműködésre, azonkívül sejtosztódások során öröklődik az utódsejtre, de generációk között kicserélődhet. DNS citozil-5-metiláció eukaryotákban a DNS egyetlen természetes kovalens módosítása, és az előbbi szempontoknak is megfelel, így lehetséges, hogy a genomi bevéődés jeleként működik (31).

II.2. Anyai és apai bevéődésű gének kifejeződése és metiláltsága parthenogenetikus és androgenetikus embrionális őssejtek *in vitro* differenciálódása során

A genomi bevéődés mechanizmusának tanulmányozása biokémiai módszerekkel megkívánja, hogy elegendő vizsgálati anyag (sejt, szövet) álljon rendelkezésünkre. Mivel a PG és GG, illetve az AG egerek nehezen nyerhetők, és korai embrionális korban elpusztulnak, más alternatíva után néztünk. Embrionális őssejtek (ES) a hólyagcsíra belső sejtcsoportjából származnak, és annak *in vitro* megfelelői (32). Szuszpenziós kultúrában az *in vivo*-hoz hasonló

sokirányú (azonban rendezetlen) differenciálódásra készíthetők, letapadva pedig fenntarthatók totipotens és végtelenül osztódó sejtekként.

PG, AG és vad típusú (VT) zygótákból készített ES sejteket szuszpenziós kultúrában differenciálódásra készítettünk (33). Northern hybridizációs kísérletekkel kimutattuk, hogy az így kifejlődött PG és AG szövetgömböcskében-hólyagocskáiban a normális embrionális szövetféleségek marker génjei a VT-hoz hasonlóan fejeződtek ki a 14 napos fejlődés során. Az anyai bevésződésű gének (*H19* és *Igf2r*) azonban a differenciálódó AG sejtekben a VT-ban tapasztaltnál jóval alacsonyabb szinten fejeződtek ki, míg az apai bevésződésű gének (*Igf2* és *Snrpn*) a PG sejtekben mutattak nagyon gyenge működést. Az *Igf2* és *Snrpn* gének az AG sejtekben, az *H19* gén a PG sejtekben a VT-nál kétszer nagyobb aktivitást mutattak, ami valószínűleg azt jelenti, hogy AG sejtekben a mindkét apai *Igf2* és *Snrpn* gén, illetve PG sejtekben mindkét anyai *H19* gén működött. A DNS citozil-5-metiláció az *H19*, *Igf2r* és *Igf2* gének reguláló régióin PG és AG sejtekben különbségeket mutatott Southern hibridizációs kísérletekben (33). Ezek a metiláció különbségek valószínűleg a genomi bevésződés mechanizmusának elemei.

Összevetve a génkifejeződési és DNS citozil-5-metilációs adatokat, úgy gondoljuk, hogy egy értékes modellrendszer áll rendelkezésünkre a genomi bevésződés mechanizmusának biokémiai vizsgálatára. Ezt a rendszert alkalmazva jelenleg az *H19* gén promoterének *in vivo* footprint analízisét végezzük.

II.3. Egér embriók sorsa, amelyek a hetedik kromoszóma bevésződött régiójából két apai eredetűt hordoznak

Genetikai kísérletekben azt találták, hogy egérben mindössze két kromoszóma darab, a hetedik kromoszóma vagy a tizenkettedik kromoszóma disztális végének apai megkettőződése okoz embrionális halandóságot. Vajon ezek a kromoszóma szegmentek felelősek-e az AG embriók beágyazódás körüli haláláért? Mikor halnak meg pontosan a hetedik kromoszóma apai megkettőződését hordozó embriók?

A hetedik kromoszóma disztális végére több genomi bevésződést mutató gén térképeződik (26), az apai kifejeződésű *Igf2* és *Ins2* és az anyai kifejeződésű *H19* és *Mash-2* gének (34).

Ezen kromoszóma szegment apai megkettőződése esetén a VT-nál kétszer erősebb *Igf2* és hiányzó *H19* és *Mash-2* génexpressziót vártunk, anyai megkettőződés esetén pedig hiányzó *Igf2* és a VT-nál kétszer erősebb *H19* és *Mash-2* kifejeződést. Northern kísérletekkel megmutattuk, hogy ez igaz az *Igf2* és *H19* gének esetén (35), a *Mash-2* gén esetén pedig a várakozást in situ hibridizáció segítségével bizonyítottuk. A hetedik kromoszóma disztális megkettőződése valójában a *Mash-2* knock-out fenotípusát (34) eredményezte, ami a szivacsos trophoblast teljes hiánya, és halál az embrionális fejlődés 9,5-ik

napján. Mivel az *Igf2* és az *H19* gének nullmutációi önmagukban nem halálosak (29,36), nagyon valószínű, hogy a hetedik kromoszóma apai megkettőződését hordozó embriók halálának oka a *Mash-2* gén hiánya, ennek következtében a trophoblast fejletlensége. Az AG embriók halála az embrionális fejlődés korábbi szakaszában történik, ezért ebben a hetedik kromoszóma disztális végén kívül más kromoszóma darab(ok)nak is jelentősége van.

II.4. Anyai és apai bevésődésű gének kifejeződnek mindkét alléljukról az egér csíravonalban: az anyai és apai jelek eltörlődése generációk között

A kromoszómák anyai vagy apai genomi bevésődésének egyszerű logikai alapon az anyai, illetve apai csíravonalban kell megtörténnie, miután az egyedről az ivarmeghatározáskor eldőlt, hogy apai vagy anyai kromoszómát örökít-e utódaira. Először a korábbi generációból származó jelnek kell eltörlődnie, majd az új jelnek kell bevésődnie, ami tükrözi az egyed nemét az utódban (minden egyed egy apai és egy anyai kromoszómát hordoz, amiből két egyforma: vagy anyai vagy apai jelű lesz, és így adódik át az utódnak). Az autoszómás genomi bevésődésű gének csíravonalbeli kifejeződéséről e munkánk szolgáltatja az első információ sorozatot.

Az egér őscsírasejtek a 6.5 napos embrióban jelennek meg, egy alkalikus foszfatáz enzimaktivitás alapján festődő sejtcsoport formájában. Ezek az őssejtek az embrionális ektoderma allantois felőli csücskéből mitotikus

osztódások közben vándorolnak a gonádok felé, ahova a 10.5 és 11.5 napok között érnek be. Az ivari differenciálódás 12.5 naptól indul meg, innentől beszélhetünk petefészekről illetve heréről. A petefészekben 13.5 napon kezdődik a női csírasejtek meiotikus osztódása, amelyek aztán a 15.5 naptól ivarérettségig a pachytén szakaszban fognak várakozni, hogy petesejtté érhessenek. A herékben a 15.5 naptól a születés utáni 7. napig a hím csírasajtek mitotikus szünetet tartanak. A 7. naptól kezdve azonban folyamatosan osztódnak mitotikusan és meiotikusan egyaránt.

A genomi bévésődésű gének allél-specifikus kifejeződését egy nagyon érzékeny és kvantitatív módszerrel (37) vizsgáltuk a hím és a nőstény egér csíravonal fejlődésének fontos szakaszaiban. Miután a vizsgálandó génekről átíródó mRNS-ek nukleotidsorrendjében meghatároztunk egy-egy bázisnyi különbséget két egér alfajban, *M.m. musculus* (B6) és *M.m. castaneus* (CS), e két egér alfaj egyedeinek keresztezésével az F1 nemzedékben az apai és anyai kromoszómáról származó RNS-ek között különbséget tudtunk tenni. Az F1 RNS-t gén-specifikus oligonukleotid primereket használva RT-PCR-rel felszaporítottuk, majd az izolált PCR fragmentum templáton egy oligonukleotid primerrel (ami a különbséget mutató nukleotid előtt végződött), két primerextenzió reakciót (SNuPE) végeztünk a két alfaj DNS szekvenciáját megkülönböztető két radioaktív nukleotiddal. A két radionukleotid beépülése a primerbe mérhető volt, és a két allél eredeti RNS-beli arányában történt (38).

A két anyai és két apai bevésődésű gén (*H19*, *Igf2r*, illetve *Igf2*, *Snrpn*) mindkét alléljáról kifejeződött a hím és a nőstény csíravonalban attól az időtől kezdve, hogy az őscsírasejtek bevándoroltak a gonádokba. Kimutattuk tehát, hogy az anyai és apai bevésődés eltörlődése a csíravonal mitotikusan osztódó szakaszában történik (38). Az új jelek bevésődését azonban a csíravonal fejlődése során a génkifejeződés szintjén nem tapasztaltuk, hanem egy általános "semlegesítődést" találtunk helyette. Amíg *Igf2r* expressziót találtunk a petesejtek mellett a spermatidákban is, addig *Snrpn* és *Igf2* kifejeződést tapasztaltunk "rossz" helyen, a petesejtekben is. Lehetséges, hogy a semleges génkifejeződés és a csíravonal totipotenciája között összefüggés van. A semlegesség jelentheti azt, hogy az apai, illetve anyai jel nem vésődött még rá a kromoszómákra a csíravonalban, vagy pedig azt, hogy a csíravonal nem vesz róluk tudomást, talán a jel felismerő mechanizmusának elemei (pl. szomatikus transzkripció faktorok) nem termelődnek a csíravonalban. Elképzelhető, hogy a csíravonal kromatinszerkezete különbözik a testi sejtekben tapasztalttól (nincs még olyan szorosan összecsomagolódva), és a bevésődést közvetítő enhancerek kromatinfeloldó hatására a csíravonalban még nincsen szükség a genomi bevésődéses gének átíródásához.

II.5. Anyai és apai bevésődésű gének allél-specifikus kifejeződése és transzkripció szintje az egér embrió fejlődése folyamán

A felnőtt egér testi sejtjeiben a genomi bevést mutató gének allél-specifikusan fejeződnek ki. Megvizsgáltuk négy genomi bevésődést mutató kifejeződését az egér embrió fejlődésének különböző szakaszaiban. Az egyallélos apai kifejeződés a négy sejtes szedercsírában megjelenik a *Snrpn* gén esetén, és minden szövetben úgy marad a későbbi fejlődés során is (39). A másik apai bevésődésű gén, *Igf2* egyallélosan fejeződik ki a négy sejtes morulában, de később a bélcsírában kétallélosan, majd fokozatosan csökken az anyai allél erőssége, és 8.5 nap körül és után csak az apai gén íródik át. A két vizsgált anyai bevésődésű gén (*H19* és *Igf2r*) mindkét alléljáról működik az egyedfejlődés korai szakaszában, majd fokozatosan, és különböző szövetekben különböző sebességgel anyai irányba tolódik el a génaktivitás. Megmértük a négy gén abszolút aktivitását is a különböző szövetekben és fejlődési szakaszokban. Ezt összevetve az allél-specifikus génműködéssel megállapítottuk, hogy a korai kétallélos kifejeződés nem az alacsony szintű génaktivitás következménye. Úgy látszik, hogy míg a *Snrpn* gén szabályozásában minden összetevő rendelkezésre áll az egyallélos génkifejeződéshez rögtön a zigótikus génaktivitás kezdetétől, addig a másik három génnél az egy több lépcsős folyamat eredménye (39).

Vajon a csíravonal, maga, keresztül megy-e a genomi bevésődés folyamatán, vagy kikerüli azt, megőrizve semlegességét? Erre az érdekes

kérdésre kaptunk választ abból a kísérletből, amelyben a négy- illetve nyolcsejtes szedercsíra mindegyik sejtjét egyenként megvizsgáltuk, és azt tapasztaltuk, hogy kivétel nélkül apai kifejeződést mutatnak a *Snrpn* génről (39,48). Tehát a csíravonalnak olyan sejtéből kell kifejlődnie, amelyben a genomi bevésoedés már egyszer kialakult.

II.5. Genomok közti kölcsönhatás nem játszik szerepet az anyai vagy apai kifejeződésű gének bevésoedésében

Az előbbieken leírt módszer lehetőséget nyújtott arra, hogy a genomi bevésoedés mechanizmusával kapcsolatos kérdéseket is megválaszoljunk. Többen felvetették, hogy a genomi bevésoedésben szerepet játszhat kromoszómák közötti kölcsönhatás (41-43). Kromoszómák közötti kölcsönhatás, amely a génaktivitást befolyásolja nem ritka az állat- és növényvilágban (44-47).

Vajon az egér anyai és az apai eredetű kromoszómái között létrejön-e valamiféle kölcsönhatás, ami befolyásolni tudja, vagy éppenséggel meghatározza a genomi bevésoedést mutató gének működését? A *Snrpn* és *Igf2r* gének esetén, melyek magas szintű aktivitással bírnak a korai embrió fejlődése során, meg tudtuk vizsgálni az allél-specifikus génműködést GG és AG nyolcsejtes morulákban. A VT (B6CSF1) morulához hasonló allél-specifikus génműködést találtunk a két szülői kromoszómáról, mindkét gén

esetén az egymástól függetlenül kifejlődött, de RNS izolálás előtt összekevert GG (B6) és AG (CS) morulák csoportjaiban, ahol az egyik allél a másik belső kontrolljaként szerepelt (48). Megállapíthattuk tehát, hogy a *Snrpn* és az *Igf2r* gének esetén az anyai és apai kromoszómák között nem szükséges semmiféle kölcsönhatás, amely a genomi bevéődés folyamatát befolyásolná.

Vajon allél-számolás játszik-e szerepet az AG és a GG embriók esetén a genomi bevéődést mutató gének szabályozásában? A *Snrpn* és az *Igf2r* gén mindkét apai allélja működött az AG morulák egyes sejtjeiben (48), ezért a fenti kérdésre nemmel felelhattünk.

A diploid állapot feltétele-e az egyallélos génműködésnek? Előállítottunk triploid és tetraploid morulákat, és azt tapasztaltuk, hogy a VT-nak megfelelő allélok működtek bennük (48). Tehát a diploid állapot nem feltétele a genomi bevéődést mutató gének egyallélos működésének.

Összefoglalva azt mondhatjuk, hogy az anyai, illetve apai kromoszómák önállóan rendelkeznek minden információval, amely szükséges a genomi bevéődést mutató gének egyallélos kifejeződéséhez az egér testi sejtjeiben.

Munkánk bizonyítékot szolgáltatott arra is, hogy a genomi bevéődéses gének egyallélos helyetti -/- vagy +/- működése okozhatja valóban a GG illetve AG embriók beágyazódás körüli halálát.

Utószó

Munkánk két látszólag nagyon különböző témakörben végzett vizsgálatok összefoglalása. A közös vonás közöttük az, hogy mindkét kísérletsorozat a génműködés szabályozásának eddig viszonylag kevésbé vizsgált fajtájának, a negatív szabályozásnak fontosságára mutat rá.

Irodalomjegyzék:

1. Caplan, A.I. (1984) Sci. Am. **10/1984**, 82-90.
2. Extracellular matrix genes, szerk. Sandell, L.J., Boyd, C.D., (1990) Academic Press.
3. Heinegard, D., Oldberg, A. (1989) FASEB J. **3**, 2042-2051.
4. Deák, F., Kiss, I., Sparks, K.J., Argraves, W.S., Hampikian, G., Goetinck, P.F. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83**, 3766-3770.
5. Argraves, W.S., Deák, F., Sparks, K.J., Kiss, I., Goetinck, P.F. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84**, 464-468.
6. Neame, P.J., Christner, J.E., and Baker, J.R. (1986) J.Biol. Chem. **261**, 3519-3535.
7. Périn, J.-P., Bonnet, F., Thurieau, C., and Jolles, P. Biol. Chem. **262**, 13269-13272.
8. Paulsson, M., Heinegard, D. (1981) Biochem. J. **197**, 367-375.
9. Kiss, I., Deák, F., Mestric, S., Delius, H., Soós, J., Dékány, K., Argraves, W.S., Sparks, K.J., Goetinck, P.F. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84**, 6399-6403.
10. Kiss, I., Deák, F., Holloway, R.G., Jr., Delius, H., Mebust, K.A., Frimberger, E., Argraves, W.S., Tsonis, P.A., Winterbottom, N., Goetinck, P.F. (1989) J. Biol. Chem. **264**, 8126-8134.
11. Stirpe, N.S. (1989) Development **107**, 23-33.
12. Tsonis, P.A., Goetinck, P.F. (1988) Exp. Eye. Res. **46** 753-764).
13. Paulsson, M., Heinegard, D. (1979) Biochem. J. **183**, 539-545.

14. Paulsson, M., Inerot, S., Heinegard, D. (1984) *Biochem. J.* **221**, 623-630.
15. Weintraub, H. (1985) *Cell* **42**, 705-711.
16. Tuan, D., London, I.M. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 2718-2722.
17. Muratoglu, S., Bachrati, Cs., Malpeli, M., Szabó, P., Neri, M., Dozin, B., Deák, F., Cancedda, R. and Kiss I. (1995) *Eur. J. Cell Biol.* **68**: 411-418.
18. Kiss, I., Bösze, Zs., Szabó, P., Altanchimeg, R., Barta E. and Deák, F. (1990) *Mol. Cell Biol.* **10**: 2432-2436.
19. Szabó, P., Moitra, J., Rencendorj, A., Rákhely, G., Rauch T. and Kiss, I. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**:10212-10221.
20. Mann, J. R. and Lovell-Badge, R. (1984) *Nature* **310**: 66-67.
21. Barton, S. C., Surani, M. A. H. and Norris, M. L. (1984) *Nature* **311**: 374-376.
22. Surani, M. A. H., Barton, S. C. and Norris, M. L. (1984) *Nature* **308**: 548-550.
23. McGrath, J. and Solter, D. (1984) *Cell* **37**: 179-183.
24. Lyon, M. F. and Glenister, P. H. (1977) *Genet. Res. Camb.* **29**: 83-92.
25. Cattanach, B. M. and Kirk, M. (1985) *Nature* **315**: 496-498.
26. Beechey, C. V. and Cattanach, B. M. (1995) *Mouse Genome* **93**: 89-92.
27. Bartolomei, M. S., Zemel, S. and tilghman, S. M. (1991) *Nature* **351**: 153-155.
28. Barlow, D. P., Stöger, R., Herrmann, B. G., Saito, K. and Schweifer, N. (1991) *Nature* **349**: 84-87.
29. DeChiara, T. M., Robertson, E. J. and Efstratiadis, A. *Cell* **64**: 849-859.
30. Leff, S. E., Brannan, M. L., Reed, M. L., Özelik, T., Francke, U., Copeland, N.C. and jenkins, N. A. (1992) *Nature Genet.* **2**: 259-264.
31. Riggs, A.D. (1989) *Cell Biophys.* **15**: 1-13.

32. Beddington, R. S. P. and Robertson, E. J. (1989) *Development* **105**: 733-737.
33. Szabó, P. and Mann, J. R. (1994) *Development* **120**:1651-1660.
34. Guillemont, F., Caspary, T., Tilghman, S. M., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Anderson, D. J., Joyner, A. L., Rossant, J. and Nagy, A. (1995) *Nature Genet.* **9**: 235-241.
35. McLaughlin, K. J., Szabó, P., Haegel, H. and Mann, J. R. (1996) *Development*, **122**: 265-270.
36. Leighton, P. A., Ingram, R. S., Eggenschwiler, J., Efstratiadis, A. and Tilghman, S. M. (1995) *Nature* **375**: 34-39.
37. Singer-Sam, J., LeBon, J. M., Dai, A. and Riggs, A. D. (1992) *PCR Methods Applic.* **1**: 160-163.
38. Szabó, P. E. and Mann, J. R. (1995) *Genes & Dev.* **9**:1857-1868.
39. Szabó, P. E. and Mann, J. R. (1995) *Genes & Dev.* **9**: 3097-3108.
40. Bartolomei, M. S. and Tilghman, S. M. (1992) *Seminars Dev. Biol.* **3**: 107-117.
41. Latham, K.E., Doherty, A. S., Scott, C. D., and Schultz, R. M. (1994) *Genes & Dev.* **8**: 290-299.
42. Monk, M. (1990) *Trends Genet.* **6**: 110-114.
43. Monk, M. (1995) *Dev. Genet.* **17**: 188-197.
44. Judd, B. H. (1988) *Cell* **53**: 841-843.
45. Tartof, K. D. and Henikoff, S. (1991) *Cell* **65**: 201-203.
46. Brink, R. A. (1973) *Ann. Rev Genet.* **7**: 129-152.
47. Matske, M. and Matske, A. J. M. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.* **44**: 53-76.

48 . Szabó, P. E. and Mann, J. R. (közlésre beküldve)