

***Drosophila* ekdizon receptor izoformák
genetikai és molekuláris analízise**

**Komonyi Orbán
Ph.D. értekezés**

**Szegedi Tudományegyetem
Genetikai és Molekuláris Biológiai Tanszék**

Témavezető: Dr. Maróy Péter

Szeged, 2002

KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS	4
BEVEZETÉS.....	5
1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	6
1.1. NUKLEÁRIS RECEPTOROK	6
1.1.1. A nukleáris receptorok típusai	6
1.1.2. A nukleáris receptorok szerkezete	7
1.2. DAJKA FEHÉRJÉK SZEREPE A NUKLEÁRIS RECEPTOROK MŰKÖDÉSÉBEN	9
1.3. NUKLEÁRIS RECEPTOR KOAKTIVÁTOROK ÉS KOREPRESSZOROK.....	10
1.3.1. Koaktivátorok	10
1.3.2. Korepresszorok	10
1.4. A <i>DROSOPHILA</i> EKDIZON RECEPTOR SZERKEZETE ÉS PARTNEREI	11
1.5. A <i>DROSOPHILA</i> EGYEDFEJLŐDÉS EKDIZON ÁLTAL SZABÁLYOZOTT LÉPÉSEI.....	13
1.5.1. Az ekdizon szint változásai az egyedfejlődés során	13
1.5.2. Az ekdizon szerepe az embrionális fejlődésben	14
1.5.3. Az ekdizon szerepe a lárvális vedlések szabályzásában	16
1.5.4. Az ekdizon szerepe a bábozódás és a metamorfózis során	16
1.5.5. Az ekdizon szerepe a kifejlett állapotban	17
1.6. AZ EKDIZON HATÁSMECHANIZMUSA	19
1.6.1. Ashburner modell	19
1.6.2. Az ekdizon indukálható puff gének molekuláris vizsgálata	21
1.6.3. Szöveti koordinációs modell.....	23
1.6.4. Az ekdizon puff gének funkciója és mutációi.....	25
1.7. A <i>DROROPHILA</i> EKDIZON RECEPTOR (<i>EcR</i>) GÉN SZABÁLYOZÁSA.....	28
1.7.1. Az <i>EcR</i> gén kifejeződése ekdizon indukálható	28
1.7.2. Az <i>EcR</i> gén szövetspecifikus kifejeződése	29
1.8. <i>ECR</i> MUTÁNSOK ÉS AZ <i>ECR</i> IZOFORMÁK FUNKCIÓJA A <i>DROSOPHILA</i> -BAN	30
2. CÉLKITŰZÉS.....	37
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	38
3.1. MOLEKULÁRIS MÓDSZEREK	38
3.1.1. Plazmid menekítés a letális P-inszerciós <i>EcR</i> mutánsokból	38
3.1.1.1. Genomikus DNS izolálás	38
3.1.1.2. A genomikus DNS emésztése, ligálása, transzformálása	39
3.1.1.3. Plazmid DNS izolálás	39
3.1.1.4. <i>Kompetens</i> baktérium sejtek készítése.....	39
3.1.2. P-inszerciók helyzetének térképezése Southern hibridizációval.....	40
3.1.3. P-inszerciók helyzetének térképezése PCR-rel.....	40
3.1.4. Western blot.....	41
3.1.5. RT-PCR	42
3.1.6. DNS nukleotid sorrend meghatározás	44
3.2. CITOLÓGIAI MÓDSZEREK	44
3.2.1. Lárvális nyálmirigy óriáskromoszóma in situ hibridizáció.....	44
3.2.1.1. Kromoszómapreparátum készítés	44
3.2.1.2. Előkezelés és denaturálás	45
3.2.1.3. Hibridizálás	45
3.2.1.4. Előhívás	45
3.2.2. A mutáns szövetek mikroszkópos vizsgálata.....	46
3.3. <i>DROSOPHILA</i> TÖRZSEKEL VÉGZETT KÍSÉRLETEK.....	46
3.3.1. A letális P-inszerciós <i>EcR</i> allélek azonosítása és fentípus vizsgálata	46
3.3.1.1. P-inszerciós <i>EcR</i> allélek azonosítása.....	46
3.3.1.2. Letális fázis meghatározás.....	47
3.3.2. A letális P-inszerciós <i>EcR</i> mutánsok menekítése a különböző <i>EcR</i> izoformákkal	48
3.3.3. Az <i>EcRA</i> fehérje termelését megakadályozó allélek fenotípus vizsgálata	48
3.3.3.1. Életképesség vizsgálat	48
3.3.3.2. Fertilitás vizsgálat	49

4. EREDMÉNYEK	50
4.1. <i>DROSOPHILA ECR</i> IZOFORMÁK.....	50
4.1.1. Az <i>EcR</i> régióban található EST-k egy új <i>EcRA</i> fehérjét kódoló <i>EcR</i> izoformát (<i>EcRC</i>) jelölnek ki	50
4.1.2. Az <i>EcR</i> izoformák kifejeződése a <i>Drosophila</i> egyedfejlődése során	52
4.2. LETÁLIS P-ELEM INSZERCÍÓS <i>ECR</i> ALLÉLEK.....	54
4.2.1. Letális P-elem inszerciós <i>EcR</i> (<i>EcR^P</i>) allélek azonosítása	54
4.2.2. A letális P-inszerciók az <i>EcRB</i> izoformák környezetében található	55
4.2.3. A letális P-inszerciós <i>EcR</i> allélek letális fázisa és fenotípusa.....	58
4.2.4. Az <i>EcR</i> izoformák kifejeződése a letális P-inszerciós mutánsokban	65
4.2.5. A letális P-inszerciós allélek menekítése a különböző <i>EcR</i> izoformákkal.....	68
4.3. AZ <i>ECRA</i> FEHÉRJÉT KÓDOLÓ IZOFORMÁKAT ÉRINTŐ <i>ECR</i> ALLÉLEK	71
4.3.1. <i>EcRA</i> és <i>EcRC</i> izoformákat inaktíváló P-inszerciós allélek azonosítása	71
5. MEGVITATÁS	78
5.1. INTRONBAN ELHELYEZKEDŐ P-INSZERCÍÓK AZ INTRON-KIVÁGÓDÁSBAN OKOZNAK ZAVART	78
5.2. <i>EcRC</i> MRNS SZINTEN ÚJ <i>ECR</i> IZOFORMA, MELY <i>ECRA</i> FEHÉRJÉT KÓDOL	79
5.3. AZ <i>ECRA</i> FEHÉRJE NEM ESSZENCIÁLIS A <i>DROSOPHILA</i> EGYEDFEJLŐDÉSBE.....	80
5.4. AZ <i>ECR</i> IZOFORMÁK KÉPESEK EGYMÁST HELYETTESÍVE MŰKÖDNI.....	82
5.4.1. Az <i>EcR</i> izoformák szerepe az embrionális fejlődésben	83
5.4.2. Az <i>EcR</i> izoformák szerepe a lárvális fejlődésben	84
5.4.3. Az <i>EcR</i> izoformák szerepe a metamorfózisban	85
IRODALOMJEGYZÉK	88
ÖSSZEFOGLALÁS	98
SUMMARY	103
KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE	107

KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Doktori értekezésem alapjául szolgáló kutatómunkát a Szegedi Egyetem Genetikai és Molekuláris Biológiai Tanszékén végeztem. Ezúton szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik munkámat segítették, és ezzel hozzájárultak értekezésem megszületéséhez.

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Maróy Péternek, hogy csoportjában dolgozhattam. Köszönöm a kísérleteimhez szükséges források biztosítását, mindennemű támogatását és türelmét.

Köszönöm munkatársaimnak és egyben barátaimnak, Bodai Lászlónak, Pál Margitnak Csiha Juditnak, Girma Waronak és Selen Muratoglu-nak az együtt dolgozás örömét, és hogy jóban-rosszban kitartottunk egymás mellett. Bodai Lászlónak és Pál Margitnak a külön meg kell köszönnöm a disszertációmban szereplő kísérletekben való aktív részvételüket is.

Hálás vagyok Dr. Mink Mátyásnak az első szerzős publikációm és a disszertációm megírásában nyújtott segítségéért.

Nagyon köszönöm Sinka Ritának és Dr. Kalmár Tibornak tanácsaikat és gyakorlati segítségüket disszertációm megírásában, valamint végső formába öntésében.

Nagy hálával tartozom Dr. Boros Imrének odaadó segítségéért, és hasznos tanácsaiért a dolgozatom elkészítéséhez.

Végezetül köszönöm az SZBK „*Drosophilás*” csoportjaiban dolgozóknak, hogy befogadtak maguk közé, és bármikor fordulhattam hozzájuk szakmai tanácsért.

BEVEZETÉS

A rovarok egyedfejlődésében kulcsfontosságú szabályozó elem az ecdizon (vedlési hormon). Az ecdizon közismerten nélkülözhetetlen a lárvális vedlések kiváltásában, és az utolsó lárva stádium végén a metamorfózis elindításában. Ezen kívül az ecdizon szerepet igazoltak az embrionális fejlődés és a peteérés egyes lépéseiben is.

Az eddigi ismereteink szerint a különböző fejlődési állapotokban és célszövetekben az ecdizon válasz hasonló módon realizálódik. Az ecdizon jel egy génindukciós kaszkádot hoz működésbe, aminek kulcsszereplője az ecdizon receptor. Az ecdizon receptor maga egy hormon függő transzkripciós faktor, mely közvetlenül részt vesz az ecdizon hatásra elsődlegesen indukálódó gének szabályozásában. A *Drosophila*-ban az ecdizon receptor két nukleáris receptor fehérje, *ultraspracle (usp)*, és az *ecdizon receptor (EcR)* gén termékének heterodimerje (Koelle és mtsai, 1991; Yao és mtsai, 1992; Thomas és mtsai, 1993).

Az *EcR* gén felépítése bonyolult. Két elkülönült transzkripciós kezdő pontról alternatív mRNS érés eredményeképpen három izoforma (*EcRA*, *EcRB1*, *EcRB2*) képződését mutatták ki (Talbot és mtsai, 1993).

Itt szeretném megjegyezni, hogy egy gén azon formáinak megnevezésére, melyek önálló szabályozó régióval rendelkeznek, de alternatív intron kivágódás eredményeképpen közös exonokat is tartalmaznak nem találtam megfelelő magyar kifejezést, ezért dolgozatomban az izoforma szót használom nemcsak a különböző *EcR* fehérjék, hanem a különböző gén és mRNS formák esetében is. Megkülönböztetésként ezekben az esetekben a gének jelölésére használt dőlt betűs írásmódot alkalmazom.

Az utóbbi időben számos adat látott napvilágot az *EcR* gén izoformáinak működésével kapcsolatban, azonban ennek ellenére a különböző *EcR* izoformák szerepe még nem tisztázott teljes mértékben. Kísérleti bizonyítékok utalnak arra, hogy az egyes izoformák képesek egymást helyettesíteni, ha transzgén segítségével minden sejtben nagy mennyiségben fejeztették ki őket (Li és mtsai, 2000). Nem világos azonban, hogy ez a helyettesítés hol és milyen mértékben megy végbe a normális működés során. Az irodalomban az egyes izoformák specifikus szerepét alátámasztó eredmények is találhatók (Talbot és mtsai, 1993; Mouillet és mtsai, 2001). Izoforma specifikus mutánsok hiányában az *EcRA* és az *EcRB2* izoformák funkciója ismert legkevésbé.

Disszertációmban szereplő kísérleteinkben az *EcR* izoformák szerepét vizsgáltuk. Egy új *EcR* izoforma, illetve 11 új *EcR* mutáns allél azonosításával és jellemzésével járultunk hozzá az *EcR* izoformák működésével kapcsolatos ismeretek bővítéséhez.

1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1.1. Nukleáris receptorok

1.1.1. A nukleáris receptorok típusai

A *Drosophila ecdizon receptor (EcR)* gén terméke, az EcR fehérje a gerincesekben megtalálható szteroid hormonok receptoraihoz hasonlóan a széles értelemben vett sejtmagi receptorok szupercsaládjába tartozó transzkripciós faktor. A szteroid hormon receptorokon kívül ebbe a fehérje szupercsaládjába tartoznak a retinsav, a prosztaglandin, a tiroid hormon és a D-vitamin receptorok, illetve az úgynevezett árva (orphan) receptorok is, melyek ligandja még ismeretlen, vagy ligand kötés nélkül látják el funkciójukat. Az árva receptorok teszik ki a ma ismert nukleáris receptor fehérjék döntő többségét.

A nukleáris receptorok evolúciós szempontból fiatal fehérjék, csak az állatvilágban jelentek meg, prokariótákban, gombákban és növényekben nem fordulnak elő. A közelmúltban feltárt növényi hormon hatású brasszinoszteroidok működése membrán kötött receptorokon keresztül, egészen más jelátviteli úton valósul meg (Altmann, 1998).

A nukleáris receptorok alkotják a ma ismert legnagyobb tagszámú transzkripciós faktor szupercsaládot. Az első nukleáris receptor molekuláris klónozása óta eltelt tíz év eredményeiről 1995-ben a *Cell*-ben megjelent cikksorozat jó összefoglalást ad (Beato és mtsai, 1995; Kastner és mtsai, 1995; Thummel, 1995; Mangelsdorf és mtsai, 1995a; Mangelsdorf és mtsai, 1995b).

A fehérje szupercsaládra általánosan érvényes, hogy kis molekulájú hidrofób ligandumot kötnek nagy affinitással, rendkívül szelektív módon. Ezen kívül bázissorrend specifikusan DNS-hez képesek kapcsolódni. A DNS kötésért felelős régiójuk rendkívül konzervatív. Az általuk felismert DNS szakaszok az ún. HRE-k (hormone response element) rövid, fordított vagy egyenes ismétlődések, esetleg nem ismétlődő nukleotid sorrendek lehetnek. Működésük szerint négy csoportba sorolhatjuk a nukleáris receptor szupercsalád tagjait.

Az első csoportba a gerincesek szteroid receptorai tartoznak, melyek homodimer formában, ligand függően kötődnek fordított ismétlődést tartalmazó DNS szakaszokhoz.

A második csoportot a retinsav X receptor (RXR) partnerrel alkotott heterodimerként működő nukleáris receptorok alkotják. Ilyenek pl. a retinsav (RAR), a D vitamin (VDR), a prosztaglandin receptorok. Ezen RXR-t tartalmazó heterodimerek egyenes ismétlődéseket felismerve kötődnek a DNS-hez. Az RXR ún. csendes partnerként van jelen a dimerben, mely ilyenkor nem köti saját ligandját.

A harmadik csoportba azok a receptorok sorolhatók, melyek homodimer formában egyenes ismétlődéseket ismernek fel a DNS-en. Ilyenek pl. az RXR és homológjai, valamint egyes árva receptorok.

A negyedik típus tagjai dimerizáció nélkül, ismétlődést nem tartalmazó bázissorrendekhez kötődnek. Ebbe a csoportba tartozik az ún. árva receptorok nagy része.

Az általunk vizsgált *Drosophila* ecdizon receptor (EcR) az RXR-rel heterodimer formában működő nukleáris receptorok közé tartozik.

1.1.2. A nukleáris receptorok szerkezete

A nukleáris receptorok tipikus mozaik fehérjék. Hagyományosan négy szerkezeti, és egyben funkcionális egységre, doménre oszthatjuk őket. Az N-terminális végükön a transzkripció aktiváláshoz nélkülözhetetlen A/B domén helyezkedik el, ezt követi a DNS kötő C, a kapcsoló D, majd ligand kötő E domén a fehérje C-terminális végén.

A fehérje családon belül az A/B domén aminosav sorrendje mutatja a legkisebb mértékű konzerváltságot.

A DNS kötésért felelős C domén a fehérjék legkonzervatívabb része. 66 (a tiroid receptor alcsaládban 68) aminosav hosszúságú szakasz, ami két ún. Zn-ujj motívumot tartalmaz. Ezekben jellegzetesen konzervált helyzetű négy-négy cisztein aminosav oldallánc alkot koordinációs kötést egy-egy Zn atommal. A glükokortikoid receptor (GR) (Luisi és mtsai, 1991) az ösztrogén receptor (ER) (Schwabe és mtsai, 1993), a retinsav X receptor (RXR) és a tiroid hormon receptor (TR) (Rastinejad és mtsai, 1995) esetében ismerjük a DNS kötő domén-DNS komplex röntgen-diffrakciós analízissel meghatározott kristályszerkezetét. A bázissorrend specifikus DNS kötésben az N-terminális Zn-ujj motívum részét képező P-box-nak nevezett alfa-hélix (Umesono és mtsai, 1989), illetve egy, a C doménből C-terminálisan a D doménbe átnyúló alfa-hélix vesz részt.

A D domén területén pontosabban a C és D domének határán azonosították a progeszteron receptor esetében a nukleáris lokalizációs szignált (Guiochon-Mantel és mtsai, 1989). A fehérje ezen részének szerepe van korepresszorok kötésében is (Chen és mtsai, 1995).

Az E vagy ligand kötő domén aminosav sorrendje kevésbé konzervált mint a DNS kötő rész. Jellemzően tizenegy vagy tizenkét alfa-hélix szerkezet alkotja ezt a régiót. Röntgen-diffrakciós szerkezet meghatározások, valamint mutáns receptor fehérjékkel végzett vizsgálatok révén részletesen felderítették több nukleáris receptor, így a humán progeszteron receptor (PR), ösztrogén receptor (ER), retinsav receptor (RAR), retinsav X receptor (RXR), a patkány tiroid hormon receptor (TR), és a *Heliothis virescens* lepke faj RXR ortológ (USP), ligand kötő doménjének háromdimenziós szerkezetét, azonosították a dimerizációban és a ligand kötésben résztvevő szerkezeti egységeket, valamint kimutatták a ligand kötés hatására bekövetkező szerkezeti változásokat is (Danielian és mtsai, 1992; Durand és mtsai, 1994; Baretino és mtsai, 1994; Tone és mtsai, 1994; Renaud és mtsai, 1995; Bourguet és mtsai, 1995; Wagner és mtsai, 1995; Brzozowski és mtsai, 1997; Williams és mtsai, 1998; Shiau és mtsai, 1998; Tanenbaum és mtsai, 1998; Darimont és mtsai, 1998; Billas és mtsai, 2001).

Általánosan elmondható, hogy a nukleáris receptorok ligand kötő doménjét alkotó α -hélixek több egymásra épülő rétegben helyezkednek el. A ligand kötő hely a szerkezet belsejében található, melynek kialakításában közvetlenül csak néhány α -hélix vesz részt. A ligand kötésben szerepet játszó aminosav oldalláncok zöme van der Waals kölcsönhatást létesít, csak kis hányaduk képez hidrogén hidat a liganddal. A C-terminális amfipatikus α -hélix a ligand függő transzkripció aktiválásban (AF-2) játszik fontos szerepet, emiatt AF-2 hélixnek is nevezik. A ligand megkötése az AF-2 hélix helyzetének megváltozásához vezet. Az új pozícióba kerülő hélix egyrészt a ligand kötésben vesz részt, másrészt hozzájárul a koaktivátor fehérjékkel kölcsönhatásba lépő felület kialakításához.

1.2. Dajka fehérjék szerepe a nukleáris receptorok működésében

A nukleáris receptor fehérjéket két csoportba sorolhatjuk aszerint, hogy a ligand megkötése nélkül milyen sejten belüli eloszlást mutatnak.

A gerincesek szteroid receptorainak többsége, pl. a glükokortikoid receptor (GR) (Pratt, 1993), a progesteron receptor (PR) (Guiochon-Mantel és mtsai, 1991; Lim és mtsai, 1999), a mineralokortikoid receptor (MR) (Fejes-Toth és mtsai, 1998) és az androgén receptor (AR) (Georget és mtsai, 1997) ligandjuk megkötése nélkül a citoplazmában helyezkednek el. Csak a ligand kötése után válnak képessé arra, hogy a sejtmagba jussanak, és a DNS-hez kapcsolódva ellássák a transzkripció szabályozó funkciójukat. Elsősorban a GR-ral és PR-ral végzett vizsgálatok alapján tudjuk, hogy a citoplazmában dajka fehérjéket, más néven chaperonokat tartalmazó komplexhez (molecular chaperone-containing heterocomplex MCH) kapcsolódnak. A komplexben a Hsp90 és Hsc70 chaperonokon kívül chaperonokkal kölcsönható fehérjék (Hip, Hop, és p23), és peptid kötésű prolint izomerizáló enzimek (FKBP51, FKBP52, Cyp40) is részt vesznek. Az MCH-nak fontos szerepe van abban, hogy a kezdetben ligand és DNS kötő képességgel nem rendelkező receptor ún. aporeceptor állapotba kerüljön, ami már alkalmas ligand kötésre, azonban DNS-sel még nem képes kölcsönhatásba lépni. Ehhez az érési folyamathoz *in vitro* ATP-re és Mg^{2+} ionokra is szükség van. A ligand megkötődése a receptoron ezután az MCH leválását eredményezi, és ennek következtében tud a receptor bejutni a sejtmagba, és kapcsolódni a DNS-sel (DeFranco és mtsai, 1998).

A másik csoportba tartozó receptorok, pl. az ösztrogén receptor (ER) (Htun és mtsai, 1999) és a retinsav X receptorral (RXR) heterodimerben működő TR és RAR (Zhu és mtsai, 1998; Baumann és mtsai, 2001) már ligand kötés nélkül is a sejtmagban található. Ellentétben a GR-ral, azonos körülményeket használva, a TR-t és a RAR-t nem tudták együtt tisztítani Hsp90 chaperon fehérjével (Dalman és mtsai, 1990; Dalman és mtsai, 1991). Genetikai eredmények alapján azonban úgy tűnik, hogy a RAR és a RXR esetében is szükség van a Hsp90 fehérjére ahhoz, hogy a receptor képes legyen transzkripció aktiváló funkcióját betölteni (Holley és mtsai, 1995). Összefoglalva tehát, ebbe a csoportba tartozó receptorok nincsenek kihorgonyozva a citoplazmában dajka fehérjékkel alkotott komplexben, azonban aktivitásuk elnyeréséhez valószínűleg szükséges a dajka fehérjék részvétele.

Az ekdizon receptor kölcsönhatását dajka fehérjékkel hosszú ideig nem sikerült bizonyítani. Csak a közelmúltban születtek olyan kísérleti eredmények, melyek igazolják a dajka fehérjék szerepét az aktív ekdizon receptor kialakulásában (Arbeitman és mtsai, 2000).

1.3. Nukleáris receptor koaktivátorok és korepresszorok

1.3.1. Koaktivátorok

A nukleáris receptorok ligandjukat megkötve aktiválják a célzott gének transzkripcióját. Több nukleáris receptorról kimutatták, hogy közvetlenül képesek kölcsönhatni az alap transzkripciós komplex tagjaival, pl. a TFIIB, TBP fehérjékkel (Ing és mtsai, 1992; Baniahmad és mtsai, 1993; Fondell és mtsai, 1993; Blanco és mtsai, 1995; Schulman és mtsai, 1995). Ezek a nukleáris receptor fehérjék ily módon közvetlenül is befolyásolhatják a transzkripciót. Emellett ismert az is, hogy a ligand kötött receptorok koaktivátor fehérjékkel lépnek kölcsönhatásba. Ezen fehérjék kapcsolódása a receptorhoz segíti a ligandfüggő transzkripció aktiválást. Az eddigi ismereteink szerint az NCoA protein család tagjai (SRC-1/NCoA-1, TIF-2/GRIP-1/NCoA-2, p/CIP/ACTR/AIB1), valamint a CBP/p300, és a pCAF fehérjék működnek nukleáris receptor koaktivátorként (Xu és mtsai, 1999). A TIF-2/GRIP-1/NCoA-2-t kivételével mindegyikük rendelkezik hiszton-acetiltranszferáz (HAT) aktivitással, így képesek a cél gének promóter régiójában a hiszton fehérjéket hiperacetilált állapotba hozni. Ez csökkenti a hiszton fehérjék és a DNS között fellépő kölcsönhatás erősségét, ami a tömör kromatin struktúra fellazulásához, és végső soron a transzkripció aktiválásához vezet (Xu és mtsai, 1999). Ezt a mechanizmust látszik alátámasztani, hogy a CBP és a p300 koaktivátorok csak kromatinná szerveződött templáton hatékonyak, csupasz DNS-en nem (Naar és mtsai, 1998; Kraus és mtsai, 1998).

1.3.2. Korepresszorok

Egyes RXR heterodimert alkotó nukleáris receptorok pl. a TR és a RAR ligand nélkül is kötődnek az általuk felismert DNS szakaszokhoz a célgének szabályozó régióiban, de ilyenkor gátolják a transzkripciót (Glass és mtsai, 1989; Baniahmad és mtsai, 1990). Ebben az állapotban korepresszor fehérjék (NCoR és SMRT) kapcsolódnak a receptorhoz (Chen és mtsai, 1995; Horlein és mtsai, 1995), mely fehérjék kapcsolódása esszenciális a ligand nélküli transzkripció gátláshoz. (Horlein és mtsai, 1995; Zhang és mtsai, 1998). Több kísérleti eredmény szól amellett, hogy a korepresszor fehérjék hiszton-deacetiláz (HDAC) komplexeken keresztül látják el funkciójukat (Heinzel és mtsai, 1997; Nagy és mtsai, 1997;

Ciana és mtsai, 1998; Wong és mtsai, 1998b). Az NCoR és az SMRT korepresszorok valószínűleg a Sin3 fehérje közvetítésével kapcsolódnak, a HDAC1 és HDAC2 fehérjékhez, valamint közvetlenül kölcsönhatásba lépnek a HDAC3 (Wen és mtsai, 2000), illetve a HDAC4, HDAC5, HDAC6, és HDAC7 fehérjékkel (Huang és mtsai, 2000; Kao és mtsai, 2000). A hiszton-deacetiláz útvonal mellett az NCoR és az SMRT kölcsönhatásba lépnek az alap transzkripciós komplex egyes tagjaival, pl. TFIIB, TAFII32, TAFII70 fehérjékkel, így közvetlenül is befolyással lehetnek a transzkripció alakulására (Muscat és mtsai, 1998; Wong és mtsai, 1998a).

Az egymással jelentős mértékű hasonlóságot mutató NCoR és SMRT fehérjéken kívül a közelmúltban azonosítottak egy további korepresszort (Alien), mely jelentős mértékben konzerválódott fehérje, megtalálható *Drosophila*-ban és emberben is (Dressel és mtsai, 1999). Az Alien fehérje kölcsönhat a TR-ral, de nem lép interakcióba a RAR-ral, az RXR-rel, illetve a GR-rel, tehát szelektíven csak egyes nukleáris receptorok működésében vesz részt.

Összegezve ismereteinket a korepresszor és koaktivátor fehérjéről leszögezhetjük, hogy a nukleáris receptorok transzkripció szabályozó működése egyrészt a kromatin szerkezet átalakításán keresztül valósul meg, HAT illetve HDAC fehérje komplexek részvételével. A ligand megkötése olyan konformáció változást eredményez a receptor fehérjén, ami gátolja a korepresszor fehérjék kapcsolódását, és elősegíti a koaktivátorokkal történő kölcsönhatást. Ennek következtében a korepresszor fehérjék által kihorgonyozott HDAC-ok helyett a HAT aktivitású koaktivátorok lépnek működésbe a receptor környezetében, ami transzkripció aktiváláshoz vezet. Ezen kívül azonban, egyes esetekben közvetlen kölcsönhatást is kimutattak, mind a receptor és az RNS polimeráz komplex, mind pedig a korepresszorok vagy a koaktivátorok és az RNS polimeráz komplex között, vagyis a nukleáris receptorok közvetlenül is befolyásolhatják az alap transzkripciós komplex működését.

1.4. A *Drosophila* ecdizon receptor szerkezete és partnerei

A rovarok egyedfejlődésének szabályozásában kulcs szerepet tölt be a szteroid természetű vedlési hormon, az ecdizon. Az ecdizon hatása az ecdizon receptoron keresztül valósul meg.

Megjegyzésként megemlítem, hogy az „ecdizon” szó használata a rovarok vedlési hormonjának tudományos megjelölésére pontatlan, sőt hibás. Valójában az a molekula, ami

aktív, azaz hatásos hormonnak bizonyult biológiai tesztekben, és amit az ekdizon receptor *in vivo* megköt, kémiai nevén 20-hidroxi-ekdizon, azaz az ekdizon egy származéka. A biológiai vonatkozású angol nyelvű szakirodalom azonban következetesen „ekdizon” szóval jelöli a hatékony vedlési hormon molekulát, ezért értekezésemben én is ezt a nevezéktant követem.

A *Drosophila*-ban az ekdizon receptor gént (*EcR*) molekulárisan azonosították és kimutatták, hogy az *EcR* fehérje a gerinces RXR sejtmagi receptor *Drosophila* homológjával az ultraspiracle (*usp*) gén termékével (*Usp*) heterodimert alkotva működik. Az *EcR-Usp* heterodimer képes az ekdizont, mint ligandot megkötni, és az ekdizon indukálható gének transzkripcióját aktiválni (Koelle és mtsai, 1991; Yao és mtsai, 1992; Thomas és mtsai, 1993). Az *EcR* gén a *Drosophila* második kromoszómáján a 42A citológiai régióban található, mintegy 80 kbp hosszúságú DNS szakaszra terjed ki. A génről három különböző *EcR* izoforma (*EcR-A*, *EcR-B1* és *EcR-B2*) képződését mutatták ki (Talbot és mtsai, 1993). Az egyes izoformák alternatív promóter használat és alternatív intron kivágódás eredményeképpen jönnek létre. Az *EcR* fehérje tipikus sejtmagi receptor, felfedezhetők benne a fehérje családra jellemző funkcionális egységek, domének. Az egyes izoformák az N-terminális A/B doménben különböznek egymástól, a DNS kötő doméntől kezdődően C-terminális irányban azonosak.

A *Drosophila* ekdizon receptor (*EcR-Usp* heterodimer) szteroid ligandja ellenére, szerkezetét és működését tekintve inkább a gerincesek nem szteroidokat kötő, RXR-heterodimer sejtmagi receptoraival (TR, RAR, VDR) mutat rokonságot. Az *EcR-Usp* dimer ligandkötés nélkül a sejtmagban a célgének szabályozó régióiban található felismerő helyekhez kapcsolódik. Eltérően a gerinces RXR-heterodimerektől, az ekdizon receptor esetében a dimerizáció nem csak a DNS-sel történő kapcsolódáshoz, hanem a ligand megkötéséhez is szükségesnek látszik (Yao és mtsai, 1993).

Dajka fehérjék részvételét az aktív receptor forma kialakításában a *Drosophila* ekdizon receptor esetében is igazolták (Arbeitman és mtsai, 2000). Baculovírus expressziós rendszerben előállított *EcR* és *USP* fehérjékből képződő ekdizon receptor dimer *in vitro* ligandkötő aktivitással rendelkezett, azonban nem volt képes DNS-hez kapcsolódni MCH (molecular chaperone-containing heterocomplex) komponensek (Hsp90, Hsc70, Hip, Hop, FKBP52, p23) jelenléte nélkül. Ezzel szemben MCH jelenlétében kialakuló receptor dimer DNS- és ligandkötő tulajdonsággal is rendelkezett. Kimutatták, hogy az *EcR* az *USP*-vel történő kapcsolódás előtt kölcsönhatásba lép a Hsp90 és Hsc70 fehérjékkel, és ez a kapcsolódás szükséges a DNS-kötő képesség kialakulásához, azonban a már aktív receptor forma nem igényli tovább az MCH jelenlétét. A Hsp90 és a Hsc70 fehérjék *in vivo* is

szükségesek az ekdizon receptor aktivitásához (Arbeitman és mtsai, 2000). Hasonlóan az RXR-heterodimerekhez, az ekdizon receptor is kapcsolódik korepresszor illetve koaktivátor fehérjékhez. Az SMRTER a gerinces NCoR és SMRT korepresszorokhoz hasonló funkciójú *Drosophila* protein, mely az ekdizon receptorral kölcsönhatva transzkripció gátlást eredményez. (Tsai és mtsai, 1999). A *Drosophila taiman (tai)* génje az NCoA fehérje családba tartozó nukleáris receptor koaktivátort kódol, mely *in vivo* kolokalizálódik az EcR-rel, és sejt kultúrában növeli az ekdizon receptor transzkripció aktiváló hatását (Bai és mtsai, 2000).

1.5. A *Drosophila* egyedfejlődés ekdizon által szabályozott lépései

1.5.1. Az ekdizon szint változásai az egyedfejlődés során

Az ekdizon mennyisége a *Drosophila* egyedfejlődése során jellegzetes mintázat szerint változik. Bizonyos fejlődési állapotokban a hormon koncentráció megemelkedik, majd a maximum értéket elérve újra az alap szintre csökken. Egy-egy ilyen ekdizon csúcs figyelhető meg az embrió, az első és a második lárva stádium közepén. Az embrióban mérhető maximális hormon koncentráció kb. háromszorosa a két lárva stádiumban tapasztalt csúcsoknak. A harmadik lárva stádiumra ennél bonyolultabb mintázat jellemző. Eszerint egy-egy kismértékű ekdizon szint emelkedés mutatható ki a stádium elején és közepén, majd egy magas és csúcs látható a stádium végén közvetlenül a bábozódás előtti maximummal. A bábozódás után az előbáb állapot elején alacsony az ekdizon koncentráció, ami aztán kb. 10 órával a bábozódás után újra megemelkedik, és egy kisebb csúcsot hoz létre az előbáb állapot végén. A bábban azután újra megnő a hormon koncentráció kb. a bábozódás előtti csúcs maximum értékének kétszeresére, majd fokozatosan csökken egészen a báb állapot végéig (Kozlova és mtsai, 2000). Az adult állatokban a bábból való kikelés után rohamosan csökken a mérhető ekdizon szint, ami 48 óra múlva mutat minimális értéket, ezután a harmadik napra a kikeléskor mérhető szint felére emelkedik, majd fokozatos lassú csökkenés tapasztalható. Mindkét nemből többé-kevésbé azonos koncentrációk (egy nagyságrenddel alacsonyabb, mint a bábozódás előtti maximum érték) mérhetők, és hasonló mintázatot mutat az ekdizon szintek időbeli változása is (Handler, 1982).

A lárva és előbáb állapotokban az ekdizonszint maximumok egyértelműen összefüggésbe hozhatók a fejlődés adott időszakában bekövetkező változásokkal, pl. az első

két lárva stádiumban a vedlésekkel, a harmadik lárva stádium végén a bábozódással, az előbáb állapot végén az előbáb-báb átmenettel. A többi fejlődési állapotban nehéz közvetlen kapcsolatot találni a hormon szint változásai és a lehetséges ekdizon-szabályozott folyamatok között.

Az ekdizon termelés színhelyét csak a lárva és az adult életkorban ismerjük. A lárvákban az ekdizon bioszintézis kizárólag a gyűrűmirigy prothorakális sejtjeire korlátozódik, míg a kifejlett nőstényekben a petefészkekben mutattak ki ekdizon termelést.

1.5.2. Az ekdizon szerepe az embrionális fejlődésben

Több kísérleti eredmény szól amellett, hogy az embrionális fejlődésnek vannak ekdizon szabályozott lépései, de teljes részletességgel ma még nem ismerjük ezeket a folyamatokat.

Az embrió élet 8. órája környékén megfigyelhető egy ekdizon csúcs, és ezt követően az ekdizon receptor szint (radioaktív ekdizon analóg kötő kapacitás) is megemelkedik kb. 16 órával a peterakás utáni maximummal (Deák P és mtsai, 1988). Az ekdizon receptor (*EcR*) gén klónozása után lehetőség nyílt a génről képződő mRNS-ek és fehérjék kimutatására. A korai (0-3 óra) embrióban nagy mennyiségű (anyai eredetű) *EcRA* mRNS és fehérje van jelen, majd az *EcRA* izoforma kb. 9 órával a peterakást követően zigótikusan is kifejeződik. Az *EcRBI* izoformáról csak zigótikusan termelődő mRNS és fehérje mutatható ki az embrióban kb. 15 órával a peterakás után jelentkező koncentráció maximummal (Talbot és mtsai, 1993).

A *Drosophila disembodied (dib)* gén egy citokrom P450 oxidáz (Cyp450) enzimet kódol, ami bizonyítottan részt vesz az ekdizon bioszintézisben (Chavez és mtsai, 2000). A *dib* mutáns embriókban nem játszódik le a háti záródás, hibás a középbél fejlődése, a fej kitűrődés, és nem képesek kutikulát szintetizálni.

A *dib* génen kívül ismert egy másik *Drosophila* gén is (*dare*), mely az ekdizon termelésben nélkülözhetetlen fehérjét kódol (Freeman és mtsai, 1999). A *dare* gén terméke, az adrenodoxin reduktáz, NADPH-ről ad át egy elektron párt az adrenodoxin fehérjének, ami azután továbbítja azokat a citokrom P450 enzimeknek, melyek végső soron a szteroid hormon szintézis egyes lépéseit katalizálják (Miller, 1988). A *dare* gén null mutánsai nem az embrionális fejlődés során, hanem zömmel a második lárva stádiumban pusztulnak el.

Az ecdizon receptor (EcR) gén amorf alléljeire homozigóta mutánsok embrió állapotban pusztulnak el, bár jóval kevesebb fejlődési rendellenesség figyelhető meg rajtuk, mint a *dib* mutánsokon (Bender és mtsai, 1997).

Érdekes megemlíteni, hogy az EcR heterodimer partnerét kódoló *usp* gén null mutánsai nem embrió korban, hanem elsősorban az első lárva stádiumban pusztulnak el (Perrimon és mtsai, 1985; Oro és mtsai, 1992).

Nem nyilvánvaló, hogy miért nem mutatnak egységes fenotípust azon gének mutánsai, melyek igazoltan az ecdizon termelésben, vagy az ecdizon hatás közvetítésében vesznek részt.

A *dib* és az *EcR* amorf allélek fenotípus különbségét pl. magyarázhatnánk azzal, hogy a *dib* gén által kódolt Cyp450 fehérje nem kizárólag az ecdizon szintézisben játszik szerepet, hanem más fontos funkciója is van az embrió fejlődése során. Ily módon a *dib* gén funkciójának kiesése nem csak az ecdizon által szabályozott folyamatokat gátolná, és ezért jönne létre a *dib* mutánsok esetében a súlyosabb rendellenességeket mutató fenotípus.

Egy másik elképzelhető magyarázat lehet például, ha az EcR-Usp heterodimeren kívül egy másik, elkülönült funkciójú, ma még ismeretlen ecdizon receptor fehérje létezését is feltételezzük. Ebben az esetben, az EcR fehérje az ecdizon által irányított folyamatok egy részében venne csak részt, és ezért eredményezne az „ecdizon hiány” (*dib* mutáns) erősebb fenotípust, mint az *EcR* gén inaktiválása.

Mindezekkel szemben, a legvalószínűbb feltételezés azonban az, hogy az *EcR* génről a peteérés során anyai géntermék jut a petébe, mely azután bizonyos mértékben kompenzálni tudja a zigótikus EcR fehérje hiányát, és ez vezet az *EcR* mutánsok enyhébb fenotípusához. Az *EcR* anyai hatású működését látszik alátámasztani, hogy az embrionális fejlődés korai szakaszában nagy mennyiségű *EcRA* mRNS és fehérje mutatható ki a vad típusú *Drosophila* petékben (Talbot és mtsai, 1993). Az a tény, hogy az embrionális fejlődés nem akad el, hanem normálisan lezajlik az *usp* és *dare* mutánsokban, szintén magyarázható anyai hatású géntermékek részvételével. A *dare* fehérje jelenléte a korai stádiumú embriókban jelzi a gén anyai hatású funkcióját (Freeman és mtsai, 1999). Az *usp* gén anyai hatású szerepét csíravonal mozaikok vizsgálatával igazolták (Perrimon és mtsai, 1985). Az *EcR* és a *dare* gének esetében azért nem lehetséges csíravonal mozaik kísérletekben tisztázni az anyai hatású működést, mert a homozigóta mutáns petekamrák fejlődése megreked az oogenezis középső szakaszában, így nem képződnek olyan kifejlett peték, melyekben az illető anyai hatású géntermék hiányának következményeit vizsgálhatnánk (Buszczak és mtsai, 1999).

1.5.3. Az ekdizon szerepe a lárvális vedlések szabályzásában

A rovarokban az ekdizon közismerten kulcsszereplő a lárvális vedlések szabályzásában. A *Drosophila* esetében is érvényes ez a megállapítás, melyet számos kísérleti eredmény igazol.

Az ekdizon bioszintézisben résztvevő *dare* gén null mutáns allélek letális fázisa 91%-ban a második lárva stádiumra (L2) esik, 6%-uk a második és a harmadik lárva stádium (L3) között lezajló vedlés közben pusztul el, és csak kb. 3 %-uk jut el L3-ba. A vedlés közben megrekedő lárvákban jellegzetes dupla szájhorog fenotípus figyelhető meg, amikor egyszerre jelen van bennük az L2-re és az L3-ra jellemző szájszerv is. A *dare* mutáns L2 lárvákat ekdizonnal etetve, mintegy 70%-ukban tökéletesen végbement a vedlés, és átjutottak L3-ba (Freeman és mtsai, 1999). Hasonló jelenséget tapasztaltunk egy másik ekdizon termelésben szerepet játszó gén (*DTS-3*) vizsgálata során. A *DTS-3* null mutánsok vedlésnek semmi jelét nem mutatva L1-ben pusztulnak el, míg ekdizon etetés hatására nagy részük képessé válik a vedlésre, és átjut a következő lárva stádiumba (még nem közölt saját eredmény).

Az ekdizon receptor (*EcR*) gén mindkét *B* izoformáját inaktíváló allélek, és az amorf *usp* mutánsok fenotípusa is azt mutatja, hogy az említett mutációk a lárvális vedlések normális lejátszódását akadályozzák, amit a mutáns lárvák egy részében kialakuló jellegzetes dupla szájhorog fenotípus is jelez (Perrimon és mtsai, 1985; Oro és mtsai, 1992; Schubiger és mtsai, 1998).

1.5.4. Az ekdizon szerepe a bábozódás és a metamorfózis során

Az ekdizon által szabályzott események közül legrészletesebben azokat ismerjük, melyek a harmadik lárva stádium végétől az előbáb állapot végéig tartó időszakban játszódnak le. E folyamatok részletes bemutatására az 1.6. fejezetben térek ki. Előljáróban csak annyit jegyeznék meg, hogy alapos genetikai és molekuláris biológiai kísérletek eredményeként számos olyan gént azonosítottak és elemeztek működésük szempontjából, melyek fontos szerepet töltenek be ebben a fejlődési szakaszban.

Kb. 30 órával a bábozódást követően, az ekdizon koncentráció a bábozódás előtt megfigyelhető maximális ekdizon szintnek mintegy kétszeresére emelkedik, majd fokozatosan csökken a báb állapot végéig. Ebben az időszakban nagyon keveset tudunk arról, hogy az átalakulás mely lépéseiben tölt be az ekdizon irányító szerepet.

1.5.5. Az ekdizon szerepe a kifejlett állapotban

A kifejlett egyedek vizsgálata elsősorban a nőstényekben tárt fel ekdizon által szabályozott folyamatokat. Ekdizon kezeléssel például stimulálni lehetett a zsírtest yolc protein szintézisét nőstények izolált abdomenében, és intakt hímekben is (a hímekben normálisan nem termelődik yolc protein) (Postlethwait és mtsai, 1981). A nőstények zsírtestében nagy mennyiségű aktív ekdizon receptort mutatható ki (Handler és mtsai, 1989). Ez az eredmény is arra utal, hogy a zsírtestben valóban zajlanak ekdizon irányított események.

Az ekdizon szintézis helyszínét tekintve, Rubenstein és munkatársai azt találták, hogy a petefészek *in vitro* kultúrában képes ekdizont termelni (Rubenstein és mtsai, 1982). Az *ecd^l* és a *DTS-3* hőérzékeny ekdizon hiányos mutánsok vizsgálata alapján valószínűsíthető, hogy ekdizon szükséges a peteérés normális lezajlásához (Garen és mtsai, 1977; Walker és mtsai, 1987). A közelmúltban több olyan közlemény látott napvilágot, melyek az ekdizon oogenezisben betöltött szerepéről tárnak fel további részleteket. Az ekdizon termelés két nélkülözhetetlen enzimét kódoló gének, az adrenodoxin reduktázt kódoló *dare*, és egy Cyp450 enzimet kódoló *dib*, kifejeződnek a felnőtt nőstények petefészkében (Freeman és mtsai, 1999; Chavez és mtsai, 2000). A *dare* génről képződött transzkriptum először az oogenezis 6. stádiumában lévő petekamrák dajka sejtjeiben figyelhető meg, és alacsony szinten marad egészen a 10. stádiumig, ahol aztán erőteljesen megnő a mennyisége (Buszczak és mtsai, 1999). A *Drosophila* ekdizon receptort alkotó EcR és USP fehérjék, megtalálhatók a petekamrák follikuláris és dajka sejtjeiben is a peteérés teljes időszakában (Christianson és mtsai, 1992; Buszczak és mtsai, 1999)

Az ekdizon szintézisben résztvevő, és az ekdizon receptort kódoló géneken kívül, az ekdizon hatásban szereplő elsődleges válasz gének (*E74*, *E75*, *BR-C*) is kifejeződnek a petefészekben (Buszczak és mtsai, 1999). Az *E74* és az *E75* mRNS-ek jelen vannak a germáriumban, majd az 5-7. stádiumú petekamrákban detektálhatóak újra, mind a follikuláris, mind a dajka sejtjeiben. Ezután a mennyiségük egyre nő a 10. stádiumban tapasztalt maximális szint eléréséig. A *BR-C* fehérje az 5-6. stádium közötti fejlődési szakaszban csak follikuláris sejtjeiben mutatható ki.

A *dare*, az *EcR*, az *E74* és az *E75* gének csírvonal mozaik vizsgálata igazolta, hogy ezekre a génekre szükség van az oogenezis középső szakaszában, hiszen a homozigóta petekamrák fejlődése megreked ebben az időszakban (Buszczak és mtsai, 1999). Érdekes módon az *usp* génnel végzett ilyen irányú kísérletekben nem tapasztalták a peteérés

megakadását az említett középső fázisban (Oro és mtsai, 1992). Az *usp* gén eltérő viselkedését kétféleképpen értelmezhetjük. Elképzelhető, hogy a kialakult homozigóta klón sejtjeiben a klón indukció előtti heterozigóta állapotból megmarad olyan mennyiségű vad típusú Usp fehérje, ami biztosítani tudja a normális fejlődést az oogenezis kérdéses időszakában. A másik lehetséges magyarázat az lehet, hogy az EcR-Usp heterodimeren kívül az EcR más partnerrel is képes ekdizon receptorként működni (Buszczak és mtsai, 1998).

Az *EcR* gén esetében a csíravonal mozaik vizsgálatok eredményét az *EcR^{A483T}* hőérzékeny alléllal végzett kísérletek is megerősítették. A mutáns nőstényekben restriktív hőmérsékleten drasztikusan lecsökkent a lerakott peték száma. A kiboncolt mutáns ováriumokban ebben az esetben is a peteérés középső szakaszában találtak rendellenességeket (Carney és mtsai, 2000).

Az *EcR^{A483T}* mutáns nőstények yolk protein szintézisében csak kis mértékű csökkenést tapasztaltak. Ennek talán az lehet a magyarázata, hogy az illető hőérzékeny allél csak gyenge hipomorfként viselkedik. Azonban, ebben az esetben is felmerül lehetőségként az, hogy létezik az EcR-Usp heterodimeren kívül más ekdizon receptor fehérje is, aminek szintén szerepe van a zsírtest yolk fehérje szintézisének szabályozásában.

A hímek nemzőképességében nem lehetett csökkenést megfigyelni ezekben a mutánsokban. Úgy tűnik tehát, hogy a hímek ivarsejt képzésében az ekdizonnak nincs olyan jelentős szabályozó szerepe, mint ami a nőstények esetében tapasztalható.

Érdekes megjegyezni, hogy a kifejlett egyedekben mérhető ekdizon mennyiségek csak töredékét teszik ki annak, ami a többi fejlődési állapotban észlelhető. Felmerül a valószínűsége, hogy a kifejlett egyedekben az ekdizon nem működik a teljes szervezetre érvényes általános hatású „karmesterként”, hanem csak lokálisan, esetleg a sejteknek csak egy szűk körére terjed ki a hatása, a hormon termelés közvetlen környezetében. Ezt a feltevést valószínűsíti például, hogy a petefészekben az ekdizon szintéziséért felelős *dare* gén csak bizonyos fejlődési állapotban lévő petekamrákban fejeződik ki, és az ekdizon hatására aktiválódó válasz gének is ezekben a petekamrákban lépnek működésbe. Mivel az ekdizon receptor (EcR és Usp) fehérje a peteérés minden fázisában jelen van a petekamrák mindkét sejtjében, a stádium specifikus ekdizon válasz kialakulását nagy valószínűséggel nem az határozza meg, hogy a sejtek az adott állapotban a receptor megjelenésével hormon érzékennyé válnak. Valószínűbb az a feltételezés, hogy az oogenezis meghatározott szakaszában bekövetkező ekdizon szintézis a meghatározó elem. Ha lokális ekdizon hatást tételezünk fel, létezni kell olyan mechanizmusoknak, melyek az egyébként könnyen diffundáló szteroid hormon működését a termelés környezetére korlátozzák. Ebben olyan

folyamatok részvétele valószínűsíthető, melyek hatékonyan alakítják át az aktív hormont biológiai aktivitással nem rendelkező vegyületekké. Ismert például, hogy az ecdizon nagy szénatomszámú zsírsavakkal észtereket képezve inaktiválódhat a kifejlett legyekben (Bownes és mtsai, 1988).

1.6. Az ecdizon hatásmechanizmusa

1.6.1. Ashburner modell

Drosophila-ban a bábozódás és a metamorfózis elindulása igazoltan ecdizon szabályozás alatt álló folyamatok. Az utolsó lárva stadium végén (kb 8 órával a bábozódás előtt) a lárvák abbahagyják a táplálkozást, elhagyják a táptalajt és vándorolni kezdenek. A belük fokozatosan kiürül, mozgásuk egyre lassúbbá válik, majd néhány órával a bábozódás előtt mozdulatlanra merevednek. Elülső spirákulumaik kitűrődnek, testük lekerekedik, és kialakul az előbáb (pupárium), azaz a lárvák először ún. fehérbáb állapotba (P1) jutnak, miközben kiürítik a nyálmirigyükben termelt ragasztó hatású fehérjét, és rögzítik magukat a tenyésztedény falán. Ezután kutikulájuk néhány óra alatt megkeményedik és be barnul (P2). A báb állapotban lejátszódó metamorfózis során a lárvális, általában politén szövetek (pl. a nyálmirigy, a bél, az izomzat és az epidermisz) hisztolízis következtében elpusztulnak, míg a diploid sejtekből álló imaginális szövetek (imágó korongok, imaginális gyűrűk, középbéli imaginális szigetek, hisztoblasztok, izom primordiumok) felépítik a kifejlett rovar testét. A bábozódás kezdetén leginkább az imaginális szövetekben bekövetkező változások szembetűnőek. Elindul például az imágó korongok kitűrődése, osztódni kezdenek a bél imaginális szigeteit alkotó sejtek, és az epidermiszben található hisztoblasztok. Emellett a lárvális sejtek pusztulása is elkezdődik, ami először a középbélben figyelhető meg (vakbelek rövidülése). A bábozódás folyamatát minden jel szerint a harmadik lárva stádium végén kialakuló magas ecdizon szint váltja ki. Az előbáb állapotra azután alacsony ecdizon szint jellemző, ami kb. 10 órával a bábozódás után ismét megemelkedik, egy kisebb csúcsot hozva létre. Ez az ecdizon pulzus váltja ki a fej kitűrődését, és indítja el az előbáb- báb átalakulást (P5). Ebben az állapotban indukálódik többek között az imágó korongok kutikula szintézise és a lárvális nyálmirigy hisztolízise is.

Az ecdizon molekuláris hatásmechanizmusát leíró modellt (Ashburner modell) a *Drosophila* harmadik stádiumos lárva nyálmirigyének óriáskromoszómáin megfigyelhető

puffképződési mintázat alapján alkották meg (Ashburner és mtsai, 1974). A modell *in vivo* megfigyelések és *in vitro* kísérleti eredmények összegzéséből született.

A *Drosophila* utolsó lárva stádiumának különböző szakaszaiban ún. puffok (egy-egy régió fellazulása, kiszélesedése) figyelhetők meg a nyálmirigy óriáskromoszómákon. Közülük körülbelül tíz a stádium közepétől látható. Ezek az ún. vedlések közötti (intermolt) puffok. A stádium végén, az ekdizon szint megemelkedésével ezek a puffok visszafejlődnek, és a kromoszómák más helyein új puffok alakulnak ki. Ezek kétfélek, gyorsan megjelenő ún. korai és később létrejövő ún. késői puffok.

Hat nagy méretű korai puffot írtak le, melyek a 22B4-5, a 23E, a 63F, a 74C a 74EF és a 75B citológiai helyeken jönnek létre. Emellett néhány kisebb méretű is létezik a 2B5-6, a 71CD, a 72D és a 85F régiókban. *In vitro* körülmények között a korai puffok megjelenése néhány perccel a hormon adása után következik be, majd néhány óra múlva visszafejlődnek. Méretük széles koncentráció tartományban arányos az alkalmazott hormon koncentrációjával. Fehérje szintézis gátlószerek jelenlétében is kialakulnak. Maximális méretük elérése előtt a hormon megvonására gyors visszafejlődéssel válaszolnak, azonban fehérje szintézis gátlók megakadályozzák a visszafejlődésüket.

A késői puffok több órával a hormon adása után jelennek meg. Kialakulásukhoz fehérje szintézis szükséges. Méretük nagyon szűk koncentráció tartományban függ csak a hormon koncentrációjától. Tipikus késői puffok láthatóak a 22C, a 62E, a 63E, a 71E, a 78D és a 82F kromoszómális szakaszokon, de tényleges számuk több mint száz.

Az puffok képződése alapján felállított Ashburner modell egy gén indukciós kaszkádot ír le, melynek csúcsán az ekdizon receptor áll. A modell szerint az óriáskromoszómán megjelenő puffok átíró géneket jelentenek. Az ekdizon bejutva a sejtekbe kapcsolódik a receptorával, ami azután pozitívan hat a korai puffokban található gének működésére, és gátlóan a későiekre. A korai puff gének termékei, melyek minden bizonnyal génszabályozó funkcióval rendelkező fehérjék, aktiválják a késői, feltehetően effektor gének transzkripcióját, ugyanakkor gátlóan hatnak a saját génjeikre.

Az ekdizon indukálható puffok megjelenése alapján a lárvális élet utolsó szakaszában tizenegy ún. puff stádiumot (PS) különböztetnek meg, PS1-től PS11-ig (Ashburner, 1967). A korai puffok a PS2-ben figyelhetők meg először 6-8 órával a bábozódás előtt, maximális méretüket a PS3-an érik el, és visszafejlődésük a PS4-ben következik be. A spirákulum kitűródés a PS9-10-ben, a fehér báb állapot a PS11 ben alakul ki a peterakás után kb. 120 órával. A bábozódás után további stádiumok különíthetők el PS21-ig, ami a nyálmirigy

hisztolízisével esik egybe a peterakástól számított 130-135. órában (Richards, 1976a; Richards, 1976b).

A korai ekdizon puffok nemcsak a harmadik lárva stádium (L3) végén figyelhetők meg, hanem kb.10 órával a bábozódás után (előbáb-báb átmenet) újra kialakulnak, és itt is követi őket a késői puffok megjelenése. A puff indukció két elkülönült hulláma közvetlen kapcsolatba hozható a bábozódás és az előbáb-báb átmenet előtt mérhető két hormon titer maximummal. Az említett két fejlődési szakaszban megjelenő korai ekdizon puffok részben azonosak, azonban egy részük specifikusan csak az egyik vagy a másik állapotban észlelhető. A 93F korai puff pl. csak a második hullámban jelenik meg. *In vitro* kísérletekben igazolták, hogy a puff indukció második hullámának kialakulásához szükséges a megelőző alacsony ekdizon szint, és fehérje szintézis. Tehát az előbáb állapotban egy feltételezett kompetencia faktor fehérje termelődik, amely azután lehetővé teszi a korai gének újbóli aktiválódását (Richards, 1976a; Richards, 1976b). A korai és késői puffok mellett meg kell említenünk az ún. korai-késői puffokat. Ezek némileg késve akkor jelennek meg, amikor a korai puffok elérik a maximális méretüket Fehérje szintézis gátlók akadályozzák a kifejlődésüket. A korai puffokhoz hasonlóan az ekdizon folyamatos jelenléte szükséges az indukciójukhoz. Ellentétben a késői puffokkal az ekdizon eltávolításával nem lehet előidézni idő előtti kialakulásukat (Ashburner és mtsai, 1976). Ilyen puffok figyelhetők meg pl. a 39B, 78C és a 46F régiókban. A 75CD régióban a bábozódás után kialakuló alacsony ekdizon szintű állapotban megfigyelhető egy ún. közép-prepupális puff (Richards, 1976a). *In vitro* szervtenyészetben kimutatták, hogy ez a puff magas ekdizon koncentrációt követő ekdizon megvonás hatására indukálódik, és az ekdizon szint növelésére visszafejlődéssel reagál. Viselkedése alapján ez a puff tartalmazhatja az előzőleg említett kompetencia faktor gént.

1.6.2. Az ekdizon indukálható puff gének molekuláris vizsgálata

Az elmúlt néhány évtizedben átfogó genetikai és molekuláris vizsgálatok eredményeként nagy számban azonosítottak az ekdizon hatásban résztvevő géneket, melyek működésük alapján általában jól beleilleszthetők az Ashburner modell által felvázolt hierarchikus rendszerbe. Meg kell jegyeznünk azonban, hogy a több szempontból egyszerűsített modell elvárásai nem minden esetben igazolódtak maradéktalanul.

A *Drosophila*-ban az ekdizon hatás közvetítésének első eleme, az ekdizon receptor, az EcR és az Usp sejtmagi receptor fehérjék heterodimerje (Yao és mtsai, 1992; Thomas és

mtsai, 1993). Öt korai puff gént ismerünk molekuláris szinten. Három ezek közül (az *E74* az 74EF, az *E75* az 75B, és a *BR-C* a 2B5-6 puff területén) megfelelően a modell elvárásainak DNS kötésre képes, minden jel szerint génszabályozó funkcióval rendelkező fehérjéket kódol. Mind a három gén szokatlanul nagy méretű, több izoforma képződését biztosítja (Burtis és mtsai, 1990; Thummel és mtsai, 1990; Segreves és mtsai, 1990; DiBello és mtsai, 1991). Az említett háromon kívül még két korai puff gén, a 63F és a 23E puffokban található *E63-2* és *E23* gének molekuláris szerkezetét tárták fel. Az *E63-2* egy kalcium kötő fehérjét kódol, mely valószínűleg a nyálmirigy sejtek szekréciójának szabályozásában vesz részt (Andres és mtsai, 1995; Vaskova és mtsai, 2000; Biyasheva és mtsai, 2001). Az *E23* terméke egy ABC transzporter, ami az ecdizon hatás negatív regulátoraként viselkedik. Feltehetően a sejtekben lévő ecdizon koncentráció szabályozása a feladata oly módon, hogy a hormon sejtekből történő aktív eltávolításában vesz részt (Hock és mtsai, 2000).

Az *E63-2* és az *E23* gének megismerésével az Ashburner modell egyik alap feltevése, miszerint a korai gének termékei génszabályozó funkcióval rendelkező fehérjék, módosításra szorul.

A késői puffoknak megfelelő gének közül hosszú ideig csak a 71E régióban található *L71* gének voltak molekuláris szinten jellemezve. Öt pár ellentétes orientációjú, rövid (kb. 450 bp) egymás szomszédságában elhelyezkedő gén tartozik ebbe a csoportba. Kis méretű fehérjéket kódolnak, melyek valószínűleg toxinok. Úgy gondolják, hogy a bábozódás során a nyálmirigyből szekretálódva a bábok fertőzésekkel szembeni védelmet biztosítják (Wright és mtsai, 1996). A közelmúltban meghatározták a 63E és a 82F késői puffok génjeinek (*L63* és *L82*) szerkezetét is (Stowers és mtsai, 1999; Stowers és mtsai, 2000). Mindkét gén nagy méretű, bonyolult felépítésű, sok izoformát kódol, melyek között vannak ecdizonnal nem indukálhatóak is.

A korai-késői puff gének közül háromról, a 39B puffban a *DHR39*, a 46F puffban a *DHR3*, és a 78C puffban az *E78* génekről vannak molekuláris adataink. Mind a három sejtmagi receptor fehérjét kódol (Koelle és mtsai, 1992; Ohno és mtsai, 1993; Stone és mtsai, 1993).

A 75CD régióban megfigyelhető közép prepupális puffnak megfelelő *FTZ-F1* gén két sejtmagi receptor izoformát kódol (β FTZ-F1 és α FTZ-F1) (Lavorgna és mtsai, 1993). A β FTZ-F1 izoforma minden bizonnyal az a prepupális kompetencia faktor, melynek létezését jóval a gén megismerése előtt megjósolták (Richards, 1976a). A 93F korai puff nem figyelhető meg a bábozódás előtt, specifikusan csak az előbáb állapot végén jelenik meg. Az

E93 gén található ebben a puffban. Az *E93* fehérje minden jel szerint transzkripció-szabályozó funkcióval rendelkezik (Baehrecke és mtsai, 1995).

Az *Sgs-3*, *Sgs-4*, *Sgs-5*, *Sgs-6*, *Sgs-7*, *Sgs-8* gének vedlések közti puffoknak felelnek meg. Termékeik azok a ragasztó hatású nyál fehérjék, melyeket a lárvák a bábozódás során ürítenek ki, és ezzel rögzítik magukat száraz felülethe (Meyerowitz és mtsai, 1982; McGinnis és mtsai, 1983; Guay és mtsai, 1991; Mougneau és mtsai, 1993).

1.6.3. Szöveti koordinációs modell

A hormonhatás tanulmányozására a nyálmirigy mellett az imágó korongok is alkalmasnak bizonyultak. *In vitro* tenyészetben érett harmadik stádiumú lárvákból kimetszett imágó korongok differenciálódása (kitűrődés) ekdizon kezeléssel kiváltható (Mandaron, 1970). A teljes differenciáció, azaz a korong kitűrődése és az ezt követő felnőtt kutikula kiválasztás is elérhető volt, ha a tápfolyadék hormon tartalmát a bábozódást követő *in vivo* hormon szinteknek megfelelően változtatták (Fristrom és mtsai, 1982). A párhuzam a nyálmirigyben megjelenő puffok és az imágó korongok viselkedése között nyilvánvaló. A bábozódás előtti magas hormon koncentráció váltja ki a nyálmirigyben a puff képződés első hullámát, és az imágó korongok kitűrődését. Ezután az alacsony ekdizon szintet követő újabb ekdizon csúcs hatására alakulnak ki ismét a korai majd a késői puffok a nyálmirigyben, és ekkor következik be az imágó korongok adult kutikula szintézise. Ezek alapján felmerül a kérdés, hogy a kétféle szövet ekdizonra adott válaszát biztosító molekuláris folyamatok milyen mértékben azonosak?

Az Ashburner modell puff génjeinek megismerése, és molekuláris szintű vizsgálata alapján a nyálmirigyre kidolgozott modell érvényességét kiterjesztették a szervezet többi szövetében végbemenő ekdizon indukálta változások leírására is. Elsősorban az *E74* gén vizsgálatára alapozva (az *E74* nemcsak a nyálmirigyben, hanem egyéb szövetekben is kifejeződik a metamorfózis kezdetén, valamint *E74* transzkriptum kimutatható a többi ekdizon szint emelkedéssel járó fejlődési állapotban is) fogalmazták meg az ún. szöveti koordinációs modellt (Burtis és mtsai, 1990; Thummel és mtsai, 1990), mely szerint minden célszövetben az Ashburner modellben leírt génaktivációs kaszkádhoz hasonló módon valósul meg az ekdizon válasz. Az ekdizon fő feladata a különböző szövetek fejlődésének összehangolása. Az ekdizon hatás közvetítésében résztvevő gének egy része, elsősorban az elsődlegesen indukálódó szabályozó gének azonosak a különböző szövetekben. Az ekdizon

hatás mechanizmusát leíró modell valószínűleg általánosan érvényes nemcsak a metamorfózis kezdetén, hanem a többi fejlődési állapotban megfigyelhető ekdizon által szabályozott folyamatra is.

A szöveti koordinációs modell megfogalmazása után a puff gének szövet és fejlődési állapot specifikus expressziójának tanulmányozása számos esetben megerősítette a modell érvényességét.

Andres és munkatársai teljes állatokból kivont RNS mintákban northern hibridizációval vizsgálták az ismert ekdizon indukálható gének kifejeződésének változását a harmadik lárva stádium kezdetétől az előbáb állapoton keresztül a báb kialakulásáig (Andres és mtsai, 1993). Eredményeik nagyon jó egyezést mutattak a nyálmirigy puffok kialakulási mintázatával, ami alapján arra következtethetünk, hogy ha a vizsgált puff gének működése nem korlátozódik csak a nyálmirigyre, akkor kifejeződésük a különböző szövetekben hasonló mintázat szerint alakul a metamorfózis kezdetén.

Egy másik átfogó kísérletsorozat alapján, melyben RT-PCR technikával mérték izolált nyálmirigyekben, valamint más szövetekben (zsírtest, bél, Malpighi cső, szárny imágó korong) az *EcR*, *E74*, *E75* és *Br-C* gének mRNS-ének mennyiségét a harmadik lárva stádium közepétől a nyálmirigy hisztolízisével egybeeső fejlődési állapotig (PS21), azt tapasztalták, hogy ezek a gének, a *Br-C* izoformákat kivéve, hasonló expressziós mintázatot mutatva kifejeződnek minden vizsgált szövetben (Huet és mtsai, 1993). Úgy tűnik tehát, hogy az egyes szövetekben hasonló molekuláris változások mennek végbe az ekdizon válasz során. Érdeemes megemlíteni, hogy az *EcR* (ekdizon receptor), az *E74B*, és a *BR-C* bizonyos izoformái a vedlések közötti (intermoult) puffoknak megfelelően aktiválódnak a harmadik lárva stádium közepén, alacsony ekdizon szint mellett, jóval korábban az *E74A* és *E75A* korai géneknél. Ez a megfigyelés a gének eltérő ekdizon érzékenységű promotereivel hozható összefüggésbe (Karim és mtsai, 1992).

Különböző *BR-C* izoformák elleni ellenanyagok alkalmazásával is igazolták, hogy a *BR-C* gén nemcsak a nyálmirigyben, hanem a lárvák egyéb szöveteiben is kifejeződik a metamorfózis kezdetén, azonban az egyes szövetekben jelentős mértékben eltérő izoforma eloszlást tapasztaltak (Emery és mtsai, 1994).

RT-PCR technikával az *E78* és *DHR3* korai-késői gének mRNS-ét ki tudták mutatni különféle szövetekben a bábozódás előtt (Huet és mtsai, 1995). A *DHR3* gén esetében ellenanyaggal történt festés is megerősítette ezt az eredményt (Lam és mtsai, 1997). A *DHR3* gén expressziója az egyedfejlődés során követi a magas ekdizon szintekkel jellemezhető állapotokat (Koelle és mtsai, 1992).

Az *E75*, *E74* és *BR-C* gének ekdizon indukálható módon a felnőtt nőstények petefészékében is kifejeződnek (Buszczak és mtsai, 1999).

1.6.4. Az ekdizon puff gének funkciója és mutációi

Az ekdizon válaszban szerepet játszó gének funkciójának megismeréséhez nagyban hozzájárult mutáns alléljeik vizsgálata.

A *BR-C* gént érintő mutánsok három komplementációs csoportot alkotnak (*br*, *rbp*, *l(1)2Bc*), melyek egyike sem komplementálja az összes *BR-C* izoformát elimináló *npr1* null allél letális fenotípusát. A *BR-C* mutáns egyedekben előbáb vagy báb állapotban a szövetek széles skáláján figyelhetők meg fejlődési rendellenességek (KISS és mtsai, 1978; Belyaeva és mtsai, 1980; Belyaeva és mtsai, 1981; Fristrom és mtsai, 1981; KISS és mtsai, 1988). A *BR-C* gén központi szerepet tölt be a metamorfózis során az ekdizon válaszban résztvevő gének szabályozásában (Karim és mtsai, 1993). Az *E74* gén a *BR-C*-hez hasonlóan számos ekdizon által szabályozott gén transzkripcióját befolyásolja (Fletcher és mtsai, 1995a; Fletcher és mtsai, 1995b; Fletcher és mtsai, 1997). A két ismert izoformának (*E74A*, *E74B*) megfelelően az *E74* gén alléljei két komplementációs csoportba tartoznak (Burtis és mtsai, 1990), melyek elsősorban előbáb illetve báb állapotban okoznak letalitást. Az *E74B* mutánsok jelentős részében látható rendellenes fej kitűrődés (cryptocefalia, microcefalia), és rövid deformált lábak kialakulása (Burtis és mtsai, 1990; Fletcher és mtsai, 1995a). A közép prepupális *βFTZ-F1* gén az embriónális fejlődés késői szakaszában is kifejeződik (Lavorgna és mtsai, 1991). Null mutánsai ennek megfelelően embrió állapotban pusztulnak el (Broadus és mtsai, 1999). Egy hipomorf allél segítségével, és egy másik megközelítéssel (indukálható módon kifejeztetett dupla szálú RNS technikával) igazolni tudták a gén metamorfózisban betöltött szerepét. A *βFTZ-F1* mutánsok normálisan bebábozódnak, majd az előbáb-báb átalakulás során mutatnak fejlődési rendellenességeket. A mutáns állatokban a fej kitűrődése, a lábak meghosszabbodása, és a nyálmirigy hisztolizise gátolt. A *βFTZ-F1* fehérje az ún. kompetencia faktor, melyre szükség van az előbáb-báb átmenetet biztosító ekdizon válasz kialakulásához. Hiányában nem indukálódnak ebben az állapotban az *E74A*, *E75A* és *E93* korai gének (Broadus és mtsai, 1999; Lam és mtsai, 2000). A *βFTZ-F1* gén kifejeződését az ekdizon gátolja. A *βFTZ-F1* fehérje ektopikus kifejeztetése a harmadik stádium közepén segíti a *BR-C*, az *E74A*, az *E75A* és az *E93* gének *in vitro* ekdizon indukcióját a nyálmirigyben. Emellett a *βFTZ-F1* fehérje a saját génjének negatív regulátora (Woodard és

mtsai, 1994). Ellenanyag festéssel azt is kimutatták, hogy a β FTZ-F1 fehérje, többek között, kapcsolódik az *E74*, az *E75* és az *E93* géneknek megfelelő nyálmirigy puffokhoz (Lavorrna és mtsai, 1993). A *DHR3* egy árva sejtmagi receptort kódoló korai-késői gén. A *DHR3* fehérje kötődik több ekdizon indukálható puffhoz (a *BR-C*, az *E74*, az *E75*, az *E78* és a *β FTZ-F1* géneknek megfelelő puffok) a nyálmirigy óriás kromoszómán. A *DHR3* fehérje ektópikus kifejeztetése a bábozódás előtt, gátolja a *BR-C*, az *E74A*, az *E75A* és az *E78* gének transzkripcióját, ugyanakkor indukálja a *β FTZ-F1* gén kifejeződését *in vivo*, valamint gátlólag hat a *BR-C*, az *E74A*, az *E75A* és az *E78* gének *in vitro* ekdizon indukciójára is (Lam és mtsai, 1997). További elegáns kísérletekkel azt is bizonyították, hogy a *DHR3* fehérje transzkripciót gátló funkciója, melyhez nincs szükség a fehérje DNS-kötő régiójára, valószínűleg az ekdizon receptor (*EcR*) fehérjével való kölcsönhatás útján valósul meg. Ezzel szemben a *β FTZ-F1* gén aktiválását a *DHR3* fehérje közvetlenül végzi azáltal, hogy kapcsolódik a gén szabályozó régiójában azonosított kötőhelyekhez. Emellett azt is kimutatták, hogy az *E75* korai puff gén egyik izoformája az *E75B* kölcsönhatásba lépve a *DHR3*-mal akadályozza a *β FTZ-F1* gén idő előtti indukcióját (White és mtsai, 1997). A *DHR3* null mutánsok embrió állapotban pusztulnak el, ami összhangban van azzal, hogy a gén kifejeződik az embriónális fejlődés középső szakaszában (Carney és mtsai, 1997). A *DHR3* fehérjét hősokk promotor szabályozása alatt kifejeztetve, a null mutánsokat menekíteni lehetett, és így vizsgálni tudták a gén hiányában kialakuló fenotípust a fejlődés későbbi fázisaiban, így metamorfozis idején is. Az utolsó lárva stádiumig eljutó mutánsok zömmel előbáb vagy korai báb állapotban pusztultak el. A fej kitűrődésében és a nyálmirigy hisztolízisében lehetett rendellenességeket megfigyelni. A *BR-C*, az *E74*, az *E75*, az *EcR*, az *E93*, és a *β FTZ-F1* gének kifejeződése a mutáns előbábokban jóval alacsonyabb mértékű volt, mint a vad típusú állatokban (Lam és mtsai, 1999).

Az *E93* korai puff gén a nyálmirigyben specifikusan a bábozódás után kb. 10 órával jelentkező ekdizon csúcs hatására íródik át. Ellentétben a *BR-C*, az *E74* és *E75* korai génekkel nem fejeződik ki a bábozódás előtti génaktivációs hullámban (Baehrecke és mtsai, 1995) The *Drosophila E93* gene from the 93F early puff displays stage- and tissue-specific regulation by 20-hydroxyecdysone.). Az *E93* fehérje szerkezete, sejtmagi lokalizációja, és nyálmirigy óriás kromoszóma meghatározott régióihöz való kötődése alapján nagy valószínűséggel transzkripció szabályozó funkcióval rendelkezik. Az *E93* fehérje a középbélben 2 órával a bábozódás után, a nyálmirigyben a bábozódást követő 13. órában, közvetlenül az illető szövet hisztolízise előtt jelenik meg. Az *E93* mutánsok kis mértékű (< 12%) embrió illetve lárva

letalitást mutatva, főként korai báb állapotban pusztulnak el a fej kitűrődést követően. Az adott fejlődési állapotnak megfelelő normálisan kialakult fej, tor és potroh jellemző rájuk, a lárvális nyálmirigy hisztolízise azonban nem megy végbe a mutánsokban. Az *EcR*, *BR-C*, *E74*, *E75* gének bábozódás előtti, valamint a *βFTZ-F1*, az *EcR*, és az *E74B* gének prepupális kifejeződése normális, ezzel szemben a *BR-C*, *E74A*, *E75A* korai gének és számos sejthalálban szerepet játszó gén (*rpr*, *hid*, *crq*, *ark*, *dronc*) prepupális expressziója gátolt az *E93* mutáns nyálmirigyekben. Az *E93* fehérje nyálmirigyben történő kifejeztetése megszünteti a nyálmirigy hisztolízis elmaradását a mutánsokban. Ha az *E93* fehérjét ektopikusan vad típusú állatok szárny imágó korongjában expresszáltatják, az imágó korong sejtek jelentős mértékű pusztulását lehet megfigyelni (Lee és mtsai, 2000). A felsorolt eredmények alapján az *E93* gént a lárvális szövetek hisztolíziséhez vezető ekdizon indukált sejthalál fő szabályozójának tekinthetjük.

A *crooked legs (crol)* és a *DHR78* gének szintén fontos szerplői az ekdizon által szabályozott folyamatoknak, azonban ellentétben az eddig bemutatott génekkel, ezt a két gént nem a nyálmirigy óriáskromoszómán megfigyelhető ekdizon puffok alapján azonosították.

A *crol* gén három fehérje izoformát kódol, melyek C_2H_2 cink-ujj motívumokat hordozó transzkripciós faktorok. A *crol* gén ekdizon indukálható, kifejeződése bábozódás előtt, és az előbáb állapot végén mutat maximális értéket. A *crol* mutánsok báb állapotban pusztulnak el. A fej kitűrődésben és a lábak megnyúlásában mutatnak rendellenességeket. A *crol* mutáció nem befolyásolja az ekdizon puff gének (*EcR*, *BR-C*, *E74*, *E75*, *DHR3*) bábozódás előtti indukcióját, azonban az említett gének, és rajtuk kívül a *βFTZ-F1* és az *E93* gén prepupális kifejeződése gátolt a *crol* mutáns állatokban (D'Avino és mtsai, 1998). A *DHR78* ekdizon indukálható gén nagy valószínűséggel az ekdizon által szabályott gén hierarchia tetején helyezkedik el. Mutáns lárvainak fejlődése már a harmadik stádiumba való vedlés során aszinkronná válik, és elakad a bábozódás előtt. A mutánsokban nem következik be a harmadik lárva stádium közepére jellemző ekdizon szabályozott gének (*EcR*, *E74B*, *BR-C*, *sgs-4*, *Fbp-1*) bekapcsolása, tehát a bábozódásra való felkészülést irányító ekdizon válasz sérült (Fisk és mtsai, 1998).

1.7. A *Drosophila* ekdizon receptor (*EcR*) gén szabályozása

1.7.1. Az *EcR* gén kifejeződése ekdizon indukálható

Az ekdizon receptor mennyiségének meghatározása radioaktívan jelölt ekdizon agonista (ponaszteronA) kötőkapacitás mérésével vált először lehetségessé (Maroy és mtsai, 1978). Különböző fejlődési állapotokban mérve az állatok sejtkivonatának ponaszteronA kötő képességét, az ekdizon receptor szintje csak rövid időszakokban mutatott magas értékeket, nevezetesen, az embrió élet 14-21., az első lárva stádium 15-19., valamint a harmadik lárva állapot 6-16. és 28-36. órája között (Deák P és mtsai, 1988). Úgy tűnik tehát, hogy a célszövetek nem tartalmazzák állandóan nagy mennyiségben a receptort, hanem alap állapotban alacsony szinten van jelen, és csak rövid, meghatározott időszakokban emelkedik meg a koncentrációja. Következésképpen a szövetek csak ekkor válnak hormonérzékennyé.

Ha összevetjük az ekdizon receptor mennyiségének változásait a *Drosophila* egyedfejlődése során a hormon szint változásaival, különösen az embrió és az első lárva stádium esetén, azt tapasztaljuk, hogy a hormon koncentráció növekedése és maximális értékének elérése megelőzi a receptor szint emelkedését (Maroy és mtsai, 1978; Deák P és mtsai, 1988; Maroy P és mtsai, 1988). Ez a megfigyelés felveti annak lehetőségét, hogy maga az ekdizon koncentráció növekedése váltja ki a receptor szint emelkedését. Kísérletesen igazolódott, hogy az első és harmadik lárva stádiumban ekdizon kezelés hatására a receptor mennyisége gyorsan és jelentős mértékben megnő, 3-4 órával a hormon adása után maximumot ér el, majd fokozatosan csökken. A fehérje szintézis gátlása megakadályozza a ponaszteronA kötő kapacitás emelkedését, ami a receptor fehérje *de novo* szintézisét mutatja az indukció során (Deák P és mtsai, 1988). A kísérleti eredmények alapján arra következtethetünk, hogy a ponaszteronA-t kötni képes receptor fehérjét kódoló gén vagy gének ekdizon-indukálható módon működnek. A célsejtek tehát úgy érik el hormon érzékenységüket, hogy az ekdizon hatására a receptor génjük vagy génjeik kifejeződnek, vagyis a hormonra adott első válasz a receptor gének bekapcsolása. A *Drosophila* ekdizon receptor (*EcR*) gén molekuláris azonosítása, és vizsgálata igazolni látszik ezt a feltevést. Northern hibridizáción alapuló kísérletekben kimutatták, hogy az *EcR* transzkriptumok szintjének emelkedése szervtenyészetben, hasonlóan az *E74B*, az *E75C* és a *BR-C* ismert ekdizon indukálható gének esetén tapasztalható, 10^{-9} M koncentrációjú ekdizzonnal kiváltható, míg az *E74A*, *E75A*, *E75B* korai ekdizon puff gének transzkripciója csak 10^{-8} M ekdizon

koncentráció jelenlétében indukálódott (Karim és mtsai, 1992). Vagyis az *EcR* valóban a hormonra legérzékenyebb transzkripciós egységek közé tartozik.

Egy másik kísérletsorozatban Northern hibridizációval vizsgálták, az ismert ekdizon indukálható génekről (*E74A*, *E74B*, *E75A*, *E75B*, *E75C*, *BR-C*) képződött transzkriptek mennyiségének változását az utolsó lárvastádium során, és azt mutatták ki, hogy az összes vizsgált gén mRNS-e közül az *EcR* transzkriptum időben a legelsők között jelenik meg (Andres és mtsai, 1993). Ugyanebben a kísérletsorozatban az is kiderült, hogy az *EcR* fehérje heterodimer partnerét kódoló *usp* gén konstitutívan fejeződik ki a vizsgált fejlődési szakaszban, nem mutat közvetlen ekdizon függést.

Lényegében ugyanezek a következtetések vonhatók le egy másik vizsgálat eredményeként is, melyben az ekdizon indukálható puff-stádiumok (PS) alapján határozták meg nyálmirigyek fejlődési állapotát, és ezekből kivont RNS mintákban RT-PCR módszerrel állapították meg ismert ekdizon indukálható gének mRNS-ének mennyiségét (Huet és mtsai, 1993). Az *EcR* transzkript már 90 órával a peterakás után megjelenik (ebben a fejlődési állapotban egy kis mértékű ekdizon szint emelkedés mutatható ki), kb. egyidőben az *E74B* és a *BR-C Z3* izoformájával, ezután növekszik, majd a pupárium képzés előtt 2-3 órával (PS7, 117-118 órával a peterakás után) drámaian lecsökken a mennyisége.

Mind a Northern hibridizáción, mind az RT-PCR technikán alapuló kísérletek eredményei jól egyeznek a szteroid kötés mérések alapján kimutatott receptor szint változásokkal. Az *EcR* gén a hormonra legérzékenyebb ekdizon indukálható gének közé sorolható. Ha az *EcR-Usp* heterodimer az egyetlen ekdizon kötésért felelős receptor a *Drosophila*-ban, akkor a célsejtek ekdizon érzékenységének kialakításában az *EcR* gén látszik meghatározónak.

1.7.2. Az *EcR* gén szövetspecifikus kifejeződése

Mint azt korábban említettük (1.4. fejezet), az *EcR* génről három különböző ekdizon receptor izoforma képződik (*EcRA*, *EcRB1*, és *EcRB2*).

Az *EcRA* és az *EcRB1* fehérjék ellen előállított specifikus ellenanyagokkal megvizsgálták a két izoforma eloszlását vad típusú fehér bábok (a bebábozódás utáni első 1 óra) szöveteiben. (Talbot és mtsai, 1993). Mindkét izoforma jelenléte kimutatható volt minden szövetszövetben, azonban, ahol az egyik nagy mennyiségben fordult elő, ott a másik alacsony szinten volt jelen, és fordítva. A jellegzetesen politén sejtekből álló lárvális szövetek

(nyálmirigy, zsírtest, bél, epidermisz, lárvális izmok), melyek elpusztulnak a metamorfózis során, elsősorban az EcRB1 izoformát tartalmazzák, alacsony szintű EcRA jelenléte mellett. Kivételt jelent, az ekdizon termelésért felelős prothorakális mirigy, mely fordított kifejeződést mutat. Az imaginális szövetek, melyekből a kifejlett egyed testrészei alakulnak ki a metamorfózis során két csoportot alkotnak. Az imágó korongok és az imaginális gyűrűk az előbél-középbél és a középbél-utóbél határán, valamint a nyálmirigyek tövén az EcRA izoformát tartalmazzák nagy mennyiségben, és az EcRB1-et alacsony szinten. A másik csoportba tartoznak az imaginális szigeteket alkotó sejtek a középbélben, és az ún. hisztoblaszt sejtek az epidermiszben, melyek az EcR B1 ellenanyaggal adtak erős festődést, ugyanakkor EcRA ellenanyaggal nem tudtak bennük fehérjét kimutatni.

A szerzők ezen eredmények birtokában arra következtettek, hogy az EcR izoformák eloszlása határozza meg azt (legalábbis részben), hogy az egyes szövetekben ekdizon hatására milyen fejlődési folyamat játszódik le.

A kifejlett felnőtt egyedek központi idegrendszerében található egy megközelítőleg 300 neuronból álló, heterogén sejt populáció, melynek sejtjei abban hasonlítanak, hogy magas szinten expresszálják az EcRA izoformát. Ezek a sejtek röviddel az egyed bábból való kiképzése után elpusztulnak (Robinow és mtsai, 1993). Ez a megfigyelés jó példa arra, hogy léteznek a fejlődés során azonos sorssal bíró sejtek, melyek egy bizonyos EcR izoformát tartalmaznak. Elképzelhető, hogy ezen sejtek adott időben történő pusztulása az EcRA izoforma közreműködésével valósul meg.

Az adult nőstények petefészkében tanulmányozva az EcR izoformák előfordulását, a lárvális szövetekkel ellentétben, nem tudtak izoforma specifikus ekdizon receptor eloszlást kimutatni. Az EcRA és az EcRB1 izoformák egyszerre vannak jelen a petekamra mindkét sejt típusában, a peteérés minden stádiumában (Carney és mtsai, 2000; Buszczak és mtsai, 1999). Ebben az esetben tehát, úgy tűnik, nem beszélhetünk az egyes EcR izoformák elkülönült funkciójáról.

1.8. EcR mutánsok és az EcR izoformák funkciója a *Drosophila*-ban

Michael Bender és munkatársai molekulárisan nagyon alaposan tanulmányozott EcR mutánsok listáját közölték 1997-ben (Bender és mtsai, 1997). A közlemény 28 EMS indukált EcR allélról számol be. Közülük 19-ben bázispár pontossággal meghatározták a mutáció

helyét az *EcR* gén kódoló régiójában. Ezek az EMS hatás természetének megfelelően elsősorban nukleotid cserék, vagy egy kis részük rövid deléció.

A mutánsok fenotípusa minden esetben letális. A letális fázisuk alapján három fenotípus osztályba sorolhatók. Embrió vagy első lárva stádium letálisok (20 db), nem bábozódó vagy harmadik lárva stádium végi letálisok (6 db), és előbáb letálisok (2 db).

A korai letális csoport tagjaiban a mutáció következtében létrejött nukleotid sorrend változás az *EcR* izoformák közös régióját érinti, következésképpen mind a három izoformát működésképtelenné teszik. Azok az allélek, melyekről olyan csonka fehérje képződik, ahol a DNS és/vagy a ligand kötő domén nagy része hiányzik, amorf alléleknek tekinthetők. Ezek hemizigótái főleg az embrionális fejlődés végén, és néhány százalékban közvetlenül a petéből való kikelés után pusztulnak el. Az elpusztult embriók kutikulája normális, csupán a has oldalon található horog sorokban lévő fogak száma és mérete mutat bizonyos mértékű csökkenést.

Három olyan allét találtak, melyek szintén az izoformák közös régiójában hordoznak mutációt, azonban vagy a nem bábozódó, vagy az előbáb letális csoportba tartoznak. Ezek nyilvánvalóan hipomorf *EcR* allélek.

Két független *EcRBI* izoforma specifikus mutánst azonosítottak. Mindkét esetben kizárólag a *BI* izoforma kialakításában résztvevő exon területén keletkezett egy-egy stop kodon a mutáció eredményeként, és a másik két izoforma érintetlen maradt. Fenotípusuk alapján ezek az allélek a nem bábozódó csoportba tartoznak.

Egy másik kísérleti megközelítés eredményeként mindkét *EcRB* izoformát elimináló, de az *EcRA*-t nem érintő alléleket állítottak elő (Schubiger és mtsai, 1998). Az *EcRB* izoformák promoter régiójába ékelődött P-elem inszerciót mobilizálták, és tökéletesen kiugrásra szelektálva deléciókat hoztak létre, melyek eltávolították a szabályozó régió egy részét, és az első *B* izoforma specifikus exont. Ezek az allélek, ellentétben az *EcRBI* specifikus allélekkel, jelentős mértékű letalitást mutatnak a lárvális vedlések során. Az első vagy a második stádiumban megrekedt lárvákban jellegzetes dupla szájhorog fenotípus figyelhető meg, amikor is az első és második, vagy a második és harmadik lárva stádiumra jellemző szájszerv egyszerre jelen van az állatokban, mutatva, hogy a vedlés elkezdődött, de nem tudott tökéletesen végbemenni.

Tong-Ruei Li és Michael Bender az egyik *EcR* amorf allél hemizigóta mutánsait menekítették transzgenikus állatokban hőindukálható módon kifejeztetve az *EcR* izoformákat (Li és mtsai, 2000). Az első lárva stádiumba átsegített lárvák fejlődése elakadt a stádium végén, ha nem alkalmaztak további hő sokkot. Nagy többségük mutatta a dupla szájhorog

fenotípust. Ugyanezt tapasztalták a második stádiumban is. A harmadik stádiumba menekített lárvák normálisan fejlődtek a stádium elején, azonban a vándorló állapotot (normálisan kb. 24-36 órával a vedlés után) már jóval később érték el (48-72 órával a vedlés után) mint a vad típusú kontroll, majd bábozódás nélkül elpusztultak. Annak ellenére, hogy az említett mutánsokban *EcR* fehérjét nem lehetett kimutatni, elindultak bennük (majd röviddel ezután elakadtak) olyan változások, amiket közvetlenül az ecdizon hatással szoktak összefüggésbe hozni, így pl. a vakbelek rövidülése, és az imágó korongok kitürődése. Ez talán abból adódhat, hogy az alkalmazott hőindukálható promotor hősokk nélkül is biztosít minimális átírást. Ennek eredményeként keletkezhetett a kimutathatóság szintje alatti mennyiségben *EcR* fehérje, és ez eredményezhette az említett szövetek ecdizon érzékenységét.

Az eddig bemutatott mutánsok vizsgálata egyértelműen mutatja az *EcR* izoformák részvételét az embrionális fejlődés, a lárvális vedlések, és a bábozódás szabályozásában, ugyanakkor ezen allélek nem adtak lehetőséget arra, hogy az egyedfejlődés későbbi szakaszaiban nyerjünk betekintést azokba a folyamatokba, melyekben az *EcR* gén szerepet játszik. A következő részben két olyan közlemény eredményeit mutatom be, ahol hipomorf, vagy kondicionális *EcR* mutánsokat használtak, és az ecdizon receptor funkciójáról báb, vagy adult fejlődési állapotokban kaptak információt.

D'Avino és munkatársai egy hipomorf P-inszerciós *EcR* allélt használtak kísérleteikben. Erre az allélra homozigóta egyedek kb. 30%-ban életképes adultokká fejlődnek, míg a fennmaradó 70%-uk farát adult állapotban pusztul el. A kifejlett mutánsok gyakran mutatnak a szárnyakon megfigyelhető fejlődési rendellenességet. A vizsgálatok eredményeként beigazolódott, hogy az *EcR* gén részt vesz a metamorfózis során a *Drosophila* szárny morfogenezisében oly módon, hogy az integrin gének szabályozásán keresztül a sejttadhéziót befolyásolja (D'Avino és mtsai, 2000). Hőmérséklet érzékeny mutáns allél felhasználásával az *EcR* gén oogenezisben való részvételét is sikerült igazolni (Carney és mtsai, 2000). Az illető allél az *EcR* izoformák közös régiójában hordoz báziscserét, tehát segítségével hőmérséklet-függően egyszerre inaktiválhatjuk mindhárom izoformát a mutánsokban. A szerzők kimutatták, hogy az adult petefészekben mind a folliculáris sejtek, mind a dajka sejtek expresszálják az *EcRA* és az *EcRBI* izoformát is az oogenezis minden stádiumában. Restriktív hőmérsékleten a mutáns nőtények lerakott petéinek száma erősen lecsökkent, míg a hímek fertilitását tekintve nem volt észlelhető különbség. A mutáns ovariolákban jellemzően csökkent a 8. és 9. stádiumú petekamrák száma, míg feltűnően sok 14. stádiumban levő, érett petét tartalmazó petekamrát találtak. Gyakran három 14. stádiumú petekamra is található egyszerre az ovarióla poszterior végén, melyek érett petéit, úgy tűnik,

képtelen lerakni a nőtény. Ezen kívül abnormális 8. és 9. stádiumú petekamrák is gyakoriak, melyekben vagy a folliculáris, vagy a dajka sejtek, vagy mindkettő száma, illetve mérete csökkent. A yolk protein szintézis kis mértékű csökkenése is jellemző a mutáns nőtényekre.

Csíravonal mozaik analízisben az *EcR* null allélre homozigóta ováriumokban a 6.-7. stádiumban megrekedt petekamrákat találtak, ami szintén arra utal, hogy az *EcR* fehérjére szükség van az oogenezis ezen szakaszában (Buszczak és mtsai, 1999).

Az *EcR* mutánsokkal kapcsolatos eredmények több érdekes problémát vetnek föl. Az a tény, hogy mindhárom *EcR* izoforma inaktiválása embrió letalitást eredményez, míg csak az *EcRBI*, vagy együtt mind a két *EcRB* izoformát érintő mutációk nem okoznak zavart az embrionális fejlődésben, formális logika alapján azt valószínűsíti, hogy az *EcRA* izoforma lenne a felelős az embrió állapotban működő ekdizon szabályozott folyamatok irányításáért. Azonban egy másik lehetséges magyarázat is létezik, miszerint az embrionális időszakban az egyes *EcR* izoformák helyettesíteni tudják egymást funkciójukban, így csak mind a három izoforma együttes hiánya esetén válnak működésképtelenné az ekdizon által szabályozott folyamatok, és következik be a letalítás.

Az *EcR* mutánsok segítségével bepillantást nyerhetünk az *EcR* izoformák lárvális vedlések során betöltött szerepébe is. Abban az esetben, amikor *EcR* amorf mutánsokat segítettek át az embrió állapotból az első lárva stádiumba *EcR* izoformák hőindukált kifejeztetésével, majd a további menekítést megszüntették, minden lárva fejlődése megrekedt a stádium végén (Li és mtsai, 2000), szemben az *EcRBI-B2* közös mutánsokkal, melyek egy része (8-60% alléltól függően) képes volt normálisan vedleni, és átjutni a következő lárva stádiumba (Schubiger és mtsai, 1998). Az *EcRBI* mutánsok főként nem bábozódó fenotípust mutatnak, azonban egy részük (28%) szintén elpusztul az első vagy a második lárva stádiumban (Bender és mtsai, 1997). *EcRA* és *EcRB2* mutáns fenotípusok hiányában az embrionális fejlődéshez hasonlóan a lárvális vedlések kapcsán sem alkothatunk teljes képet az *EcR* izoformák funkciójáról, azonban a bemutatott eredmények alapján néhány megállapítás leszögezhető:

1. Az embrionális fejlődéssel ellentétben, önmagában egyik *EcR* izoforma sem képes teljes mértékben ellátni a lárvális vedlésekhez szükséges ekdizon receptor funkciót.
2. Valószínűleg egyik *EcR* izoformának sincs kizárólagos szerepe a vedlések szabályozásában, mivel csak abban az esetben gátolt teljes mértékben a vedlés, ha mindhárom izoforma hiányzik.

3. A különböző *EcR* izoformáknak nagy valószínűséggel nincs specifikus szerepe a lárvális vedlések során, hanem egymást kiegészítve működnek. Az *EcR* fehérje össz mennyisége tűnik meghatározónak.

Az *EcR* izoformák eltérő szöveti kifejeződése alapján William S. Talbot és munkatársai arra következtettek, hogy a metamorfózis időszakában az egyes izoformák önálló, elkülönült funkcióval rendelkeznek, és az adott szövet sorsát a metamorfózis során az szabja meg, hogy melyik *EcR* izoforma fejeződik ki benne nagy mennyiségben (Talbot és mtsai, 1993). Michael Bender és szerzőtársai ennek a feltevésnek megfelelően próbálták az *EcR BI* mutánsok fenotípusát értelmezni (Bender és mtsai, 1997). A mutánsok a bábozódás előtt pusztulnak el, azonban pl. a láb imágókorongok elkezdnek bennük kitűrődni (Az imágó korongok kitűrődése *in vitro* szövet kultúrában ekdizon kezeléssel kiváltható), de a fejlődésük megáll ebben az állapotban. Az imágó korongokban *EcRA* izoforma található nagy mennyiségben, így az *EcRBI* mutánsban a láb diszkusz kitűrődését, az *EcRA* izoforma meglétével magyarázták. Megvizsgálva az elsősorban *EcRBI* izoformát tartalmazó szövetek (a középbél politén lárvális sejtjei, az imaginális szigetek diploid sejtjei, valamint az epidermiszben található hisztoblaszt sejtek) viselkedését a *BI* mutánsokban azt tapasztalták, hogy bennük szintén elindulnak azok a változások, melyek a bábozódás idején normálisan lezajlanak, azonban ezek a folyamatok röviddel ezután megrekednek. A szerzők, ragaszkodva ahhoz a prekoncepcióhoz, hogy az *EcR* izoformák specifikus funkcióval rendelkeznek, úgy interpretálták ezt az eredményt, hogy ezekben a szövetekben az *EcRBI* izoforma hiányában nem mennek végbe a bábozódás idején lejátszódó ekdizon által szabályozott események.

A közleményben szereplő kísérleti eredményeket, a szerzőkkel ellentétben, úgy is értelmezhetjük, hogy mindkét szövetféleségben elkezdődnek az adott fejlődési állapotra jellemző változások, de ezek egy bizonyos időn belül elakadnak. Tehát nem látszik teljesen megalapozottnak az a feltételezés, hogy a szövetek ekdizonra adott választ, vagyis a sorsát a metamorfózis során, az általuk nagy mennyiségben kifejezett *EcR* izoforma határozná meg.

Egy másik ellentmondó értelmezésről is szeretnék szólni, mely szintén az *EcR* izoformák kizárólagos, vagy egymást helyettesítő funkciója körüli bizonytalanságot veti fel. Az *EcRBI* mutánsokat menekítve olyan transzgenikus konstrukciókkal, melyek hősokk indukálható promoter szabályozása alatt tartalmazták a különböző *EcR* izoformák cDNS-eit, azt tapasztalták, hogy mindhárom izoforma kifejeztetése képes volt kifejlett állapotig menekíteni a mutánsokat (Bender és mtsai, 1997). A nyálmirigy óriáskromoszómán ekdizon hatására megjelenő puff-okat analizálva azonban, bizonyos puffok esetében különbséget

lehetett megfigyelni az egyes izoformákkal történt menekítés esetén, vagyis a három *EcR* izoforma eltérő mértékben állította helyre az illető puff méretét. Az ellentmondást a szerzők azzal oldják fel, hogy valójában nem zárható ki teljesen bizonyos mértékű átfedés az egyes *EcR* izoformák funkciójában, és a nem várt sikeres menekítéseket az életképesség tekintetében az magyarázná, hogy a kísérletek során minden szövetben folyamatosan nagy mennyiségben fejeztették ki az egyes izoformákat. Az ekdizon indukálta óriáskromoszóma puffok vizsgálata alapján (mely szerintük finomabb betekintést nyújtva, hitelesebben tükrözi az *EcR* izoformák működését) azonban azt gondolják, hogy a valóságos helyzetben az *EcR* izoformák funkcionális különbözősége mégiscsak fontos tényező.

Az a kísérlet sorozat, melyben mindhárom *EcR* izoformát kiejtő amorf mutánsokat menekítettek a különböző *EcR* izoformák kifejeztetésével, szintén azt mutatja, hogy az *EcR* izoformák képesek egymást kölcsönösen helyettesítve működni (Li és mtsai, 2000). Ebben az esetben is mindhárom izoforma hatékonynak bizonyult, és közel azonos mértékben (az *EcRB2* és az *EcRA* izoformák 100%-ban, az *EcRBI* 83%-ban) menekítette az embrió letalitást az első stádiumos lárva állapotig. A második lárva stádiumból a harmadikba történő átmenetet az *EcRA* és az *EcRBI* kb. négyszer kisebb hatékonysággal segítette mint az *EcRB2*.

Jean-Francois Mouillet és szerzőtársai eredményeik alapján az *EcR* izoformák elkülönült szerepét hangsúlyozzák (Mouillet és mtsai, 2001). HeLa sejtkultúrában a különböző *EcR* izoformák jelenlétében ekdizonnal indukálható riporter gén kifejeződését mérve jelentős különbséget tapasztaltak az egyes izoformák tekintetében. Kimutatták továbbá, hogy az *EcRA* izoforma A/B doménja (Az egyes *EcR* izoformák csupán az N-terminális A/B doménben különböznek egymástól) génkifejeződés gátló funkcióval rendelkezik, szemben a két *EcRB* izoforma aktiváló szereppel bíró A/B doménjével.

Pier Paolo D'Avino és Carl S. Thummel egy *P{lacW}* inszerciós *EcR* mutáns vizsgálata során azt derítették ki, hogy az *EcRB* izoformák szabályozó régiójába ékelődött P elem ezen transzkriptumok csökkent mértékű kifejeződését okozza, és meglepő módon teljes egészében megakadályozza az *EcRA* izoforma kifejeződését (D'Avino és mtsai, 2000). A mutáció fenotípusa 70%-os farát adult letalítás, 30%-ban kifejlett adult egyedek kialakulása mellett. Ez az eredmény nagy mértékben aláássa azt az elméletet, miszerint az imágó korongok fejlődését a megfelelő adult képletékké az határozná meg, hogy bennük a metamorfózis kezdetén az *EcRA* fehérje van jelen nagy mennyiségben, hiszen ezen mutáns esetében az *EcRA* izoforma hiányában is kifejlett felnőtt egyedek jöhetnek létre. Az *EcRA* izoforma kizárólagos szerepe az embrionális fejlődés során szintén nem látszik megalapozottnak, mivel az említett mutáns nem mutat semmi nemű embrió letalitást.

A felsorolt példák alapján látható tehát, hogy az *EcR* izoformák szerepével kapcsolatban mindmáig egymásnak ellentmondó kísérleti eredmények és értelmezések léteznek. A közelmúlt eredményei alapján azonban több erős bizonyíték szól amellett, hogy az *EcR* izoformák egymást helyettesíteni tudják a fejlődés során. *EcRB2* és *EcRA* specifikus mutánsok jelenleg még nem ismertek. Ilyen allélek azonosítása sokat segítené abban, hogy az *EcR* izoformák egymást helyettesítő képességének mértékéről pontosabb képet alkothassunk.

2. CÉLKITŰZÉS

1. Az *EcR* gén nagy mérete és bonyolult szerkezete felkeltette bennünk a gyanút, hogy az eddig ismert három *EcR* izoformán kívül további izoformák is létezhetnek. A kérdés megválaszolására azt a stratégiát választottuk, hogy a Berkeley *Drosophila* Genom Project (BDGP) által létrehozott EST gyűjteményben azonosítjuk az *EcR* gén területére eső EST-eket, majd keresünk közöttük olyanokat, melyek nem felelnek meg egyik eddig ismert *EcR* izoformának sem. Az RT-PCR módszer lehetőséget kínált számunkra, hogy megvizsgáljuk az esetleg felbukkanó új *EcR* izoformák kifejeződését a *Drosophila* egyedfejlődése során, majd ezt összevetve a korábról ismert izoformák kifejeződési mintázatával következtethessünk az új izoforma funkciójára.
2. Kísérleteink másik részében új *EcR* mutánsok azonosítását tűztük ki célul, egyrészt letális P-inszerciós mutáns gyűjtemény szűrésével, másrészt a *Drosophila* adatbázisokból kikeresve az *EcR* gén területére lokalizált ismert beépülési helyű P-inszerciókat. A P-inszerciók helyzete alapján, valamint a mutánsokat RT-PCR és Western blot technikával analizálva kívántuk eldönteni, hogy egy adott mutáció mely *EcR* izoforma vagy izoformák működését befolyásolja. Végeredményképpen az általunk azonosított mutánsok fenotípus vizsgálata alapján kívántunk új adatokkal hozzájárulni az *EcR* izoformák szerepének tisztázásához.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Molekuláris módszerek

3.1.1. Plazmid menekítés a letális P-inszerciós *EcR* mutánsokból

3.1.1.1. Genomikus DNS izolálás

100 db (kb.100mg) *EcR^P/BcGla* genotípusú adult legyet dörzsmozsárban folyékony nitrogénben homogenizáltunk. 2 ml jéghideg lízis puffert (100 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 50 mM EDTA, 0,15 mM spermin, 0,5 mM spermidin) adtunk hozzá, majd folytattuk a homogenizálást néhány percig. A még fagyott homogenizátumot spatula segítségével átvittük egy steril 15 ml-es centrifuga csőbe. 30 µl proteináz-K-t (20 mg/ml koncentrációjú törzs oldatból) adtunk hozzá, óvatosan összekevertük, és 2 órán át inkubáltuk 37 °C-on. Extraháltuk 2 ml ekvibrált fenollal (pH=8) 2 percig le-fel forgatva a csövet. Centrifugáltuk (2500rpm, 3 perc). Levágott végű pipetta hegygel (hogy a DNS-t minél kevésbé törjük) átvittük a felső, vizes fázist új csőbe. Extraháltuk kétszer 2 ml fenol / kloroform / izoamil-alkohol (25:24:1) eleggyel. A felső vizes fázist extraháltuk 2 ml kloroform / izoamil-alkohol (24:1) eleggyel. A felső vizes fázist új csőbe vittük, majd 0,1 térfogat 3 M-os Na-acetátot (pH=5,2) adtunk hozzá, és kicsaptuk a DNS-t 2 térfogat 96%-os etanollal 15 percig szoba hőmérsékleten. Centrifugáltuk (7000 rpm, 10perc). Beszárítottuk a csapadékot, majd feloldottuk 400µl TE-ben (pH=8). Átvittük az oldatot egy 1,5 ml- es steril eppendorf csőbe. 8 µl RN-ázt (10 mg/ml koncentrációjú törzs oldatból) adtunk hozzá, majd inkubáltuk 37 °C-on 30 percig. Extraháltuk kétszer 400µl fenol / kloroform / izoamil alkohol (25:24:1) eleggyel, majd egyszer 400µl kloroform / izoamil-alkohol (24:1) eleggyel. A felső, vizes fázist új csőbe vittük, majd 0,1 térfogat 3 M-os Na-acetátot adtunk hozzá, és kicsaptuk a DNS-t 2 térfogat 96%-os etanollal. A csapadékot mostuk 0,5 ml 70%-os etanollal, majd beszárítás után feloldottuk 100µl TE-ben (pH=8), és -20 °C-on tároltuk.

3.1.1.2. A genomikus DNS emésztése, ligálása, transzformálása

10 µl genomikus DNS-t emésztettünk 50 µl térfogatú reakcióelegyben 20 U EcoRI enzimmal (Fermentas) 37 °C-on éjszakán át. 65 °C-on 10 percig inkubálva inaktívtuk az enzimet, majd 0,1 térfogat 3 M koncentrációjú Na –acetátot és 2 térfogat 96 %-os etanolt adva az elegyhez a DNS-t kicsaptuk –20 °C-on 30 percig. A csapadékot 70 %-os alkohollal történt mosás és szárítás után 20 µl vízben vettük fel. 8 µl emésztett DNS-t agaróz gélelektóforézissel ellenőriztünk.

A fennmaradó 12 µl emésztett DNS-t 200 µl térfogatban ligáltuk 10 U T4 DNS ligáz enzimmal (Fermentas) 16 °C-on éjszakán át.

20 µl ligált DNS-t transzformáltunk 200µl *Escherichia coli* XL1-Blue (Stratagene) kompetens sejtbe. A menekített plazmidokat 50 µg/ml koncentrációban Ampicillin-t tartalmazó LB-táptalajon szelektáltuk.

3.1.1.3. Plazmid DNS izolálás

A transzformálás eredményeként kapott telepekből plazmid DNS-t alkalikus lízis módszerrel izoláltunk (Maniatis, T., Sambrook, J., and Fritsch, E. F., 1989). A plazmid DNS-eket restrikciós enzimekkel történt hasítással ellenőriztük (az enzimeket gyártó cég útmutatása szerint).

3.1.1.4. Kompetens baktérium sejtek készítése

2ml LB-ben éjszakán át növesztett XL1-Blue *E. coli* tenyésztéssel beoltottunk 100ml SOB tápoldatot 1literes lombikban.

OD₆₀₀ = 0,6-ig növesztettük 18°C-on (kb.24-28 óra). Felnövesztés után 10 percig inkubáltuk jégen. Lecentrifugáltuk a sejteket (3000 rpm, 10 perc, 4°C). A sejteket 32ml TB oldatban (vízben feloldunk 10 mM Pipes-t, 15 mM CaCl₂-ot, 250 mM KCl-ot, majd a pH-t KOH-dal 6,7-re állítva, feloldunk benne 55 mM MnCl₂-ot, és sterilre szűrjük.) finoman felfuszpendáltuk. 10 percig jégen inkubáltuk, majd lecentrifugáltuk (3000 rpm, 10 perc, 4 °C). A sejteket 8 ml TB oldatban finoman felfuszpendáltuk. 7% DMSO-t adtunk hozzá cseppenként, rázogotva, majd 10 percig jégen inkubáltuk. A kompetens sejteket 200 µl-enként

steril eppendorf csövekbe szétosztottuk, folyékony nitrogénben lefagyasztottuk, és $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk.

A sejtek kompetenciáját ismert koncentrációjú pBluescript II SK⁺ plazmiddal történő transzformációból kinövő telepek száma alapján határoztuk meg. A transzformációs gyakoriság általában 10^6 - 10^7 transzformáns telep/ μg DNS volt.

3.1.2. P-inszerciók helyzetének térképezése Southern hibridizációval

Southern hibridizációt digoxigenin jelölt DNS próbákkal végeztük, melyhez DIG DNS jelölő és DIG nukleinsav detektáló (NBT/BCIP) kitet (Boehringer GmbH) használtunk. A próbák jelölését, a transzfert, a hibridizációt és a detektálást a gyártók által javasolt körülmények között hajtottuk végre.

A plazmid menekítéssel nyert plazmidokat EcoRI és HindIII enzimekkel együtt emésztettük, a fragmenteket 1 %-os agaróz gélben elválasztottuk, pozitívan töltött nylon membránra (Boehringer GmbH) transzferáltuk, majd Southern hibridizációval vizsgáltuk a 2.1, a 3.9.1, a 2.2, a 2.10, az 5-14, az 5-7, az 5-9, a DHR42, és a 3-4 jelzésű λ fágok (Talbot és mtsai, 1993) digoxigenin jelölt DNS próbáival.

3.1.3. P-inszerciók helyzetének térképezése PCR-rel

Mivel nem ismertük a *P{lacW}* inszerciók *EcR* exonoktól mért távolságát, hosszú PCR termékek felsokszorozását lehetővé tevő körülményeket állítottunk be, mellyel 9 kb méret tartományig tudtunk sikeres amplifikációt végrehajtani. A reakciókhoz 25 bp hosszúságú $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ -nál magasabb annealing hőmérsékleten működő primereket használtunk. A denaturációt $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on végeztük 20 másodpercig. A hibridizációt és a polimerizációt egy lépésben $68\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on 10 percig végeztük. 35 ciklust hajtottunk végre. A reakciókat $50\mu\text{l}$ -es térfogatban hajtottuk végre. A reakció elegy összetétele 25 mM Tris-HCl (pH=9), 50 mM K-acetát, 0,2 mM dNTP-t, 20mM MgCl₂, 8 % glicerin, 1 % DMSO, 0,2 μM *P{lacW}* specifikus primer, 0,2 μM *EcR* specifikus primer, 0,1 μg /reakció izolált genomikus DNS templát, 5 U Taq polimeráz (ZENON Biotechnológiai Kft) volt.

A kísérletekben használt primerek:

primer7 (<i>P{lacW}</i> elem 5' vége):	aaccttcctctcaacaagcaaacg
primer8 (<i>P{lacW}</i> elem 3' vége):	ttggatgtgtagacctaaggg
primer9 (<i>EcRBI</i> első exon 5' vége):	taaacgctcaaacaccacactgg
primer10 (<i>EcRBI</i> első exon 3' vége):	gcgcgagtgagtgaggattgtgc
primer11 (<i>EcRBI</i> második exon 5' vége):	tcctctgttgctttacgaagctcgg
primer12 (<i>EcRBI</i> második exon 3' vége):	tcgctggactcgcacgactattgcg

3.1.4. Western blot

A P-inszerciós *EcR* mutánsokban western blot-tal vizsgáltuk az EcRA és az EcRB1 fehérjék jelenlétét. A letális P-inszerciós allélek esetében *EcR^P/Df(2R)nap-2* genotípusú harmadik stadiumos (L3) vándorló lárvákat vizsgáltunk. Kontrolnak *Df(2R)nap-2/+(OreR)* genotípusú L3 vándorló állatokat használtunk. Az *l(2)06410* allél esetében *l(2)06410/Df(2R)nap-2* genotípusú, az *EP(2)2509* allél esetében *EP(2)2509/EP(2)2509* genotípusú vándorló L3 és adult nőstény állatokat vizsgáltunk. Ezekhez a kísérletekhez kontrollként rendre *Df(2R)nap-2/+(OreR)* és *+(OreR)/+(OreR)* L3 vándorló lárvákat és adult nőstényeket használtunk.

A fehérje preparátumok készítéséhez egy 1,5 ml-es eppendorf csőben 10 db lárvát vagy adult nőstényt 100 µl minta pufferben (0,125 M Tris-HCl pH=6,8, 4 % SDS, 20 % glicerin, 5 % 2-merkaptó-etanol, 0,005 % brómfenolkék) 5 percig forraltuk, homogenizáltuk, majd újbóli 5 perc forralás után lecentrifugálva (2 perc 12000 rpm) a tiszta oldatot új csőbe vittük. Az így elkészített mintákat -70 °C-on tároltuk.

Az SDS-PAGE-hez X-cell mini-cell (NOVEX) futtató- és blottoló-egységet használtunk. A fehérje minták futtatását, a Comassi-festését, és a blottolást a gyártók által ajánlott körülmények között végeztük. A blottoláshoz Hybond-P PVDF membránt (Amersham) használtunk.

A mintákból 2-2 µl-t megfuttatva Comassi-festéssel ellenőriztük az egyes minták fehérje mennyiségét. Szükség esetén korrigáltuk a western blot kísérletekhez használt minta térfogatokat, hogy az egyes mintákból azonos mennyiségű fehérjét vizsgáljunk.

Az egyes mintákból általában 10-10 µl-t (1db L3 lárvának vagy adultnak megfelelő mennyiség) szeparáltunk SDS-PAGE-vel 8 %-os gélben, majd a fehérjéket PVDF membránra transzferáltuk.

A membránt ezután deszt. vízzel mostuk 1 percig, majd blokkoltuk 5 % sovány tejport tartalmazó TBST oldatban (10 mM Tris-HCl pH=8, 150 mM NaCl, 0,05 % Tween-20) 30 percig 37 °C-on. A 15G1a azonosítójú EcRA specifikus ellenanyagot (Talbot és mtsai, 1993) 50-szeresére, az AD4.4 azonosítójú EcRB1 specifikus ellenanyagot (Talbot és mtsai, 1993) 20-szorosára hígítottuk 5 % tejpor-TBST oldatban, és ebben inkubáltuk a membránt 4 órán keresztül szobahőmérsékleten. Ezután öblítettük háromszor, majd mostuk egyszer 15 percig, és kétszer 5 percig TBST-vel szobahőmérsékleten. Inkubáltuk a membránt szobahőmérsékleten 1 órán keresztül szintén 5% tejpor-TBST oldatban 2000-szeresére hígított, peroxidázzal kapcsolt nyúl anti-egér másodlagos ellenanyaggal (DAKO). A membránt háromszor öblítettük, majd egyszer 15 percig és háromszor 5 percig mostuk TBST oldatban. A detektáláshoz a membránt 10 percig inkubáltuk SuperSignal kemilumineszcens szubsztrát (PIERCE) oldatban, majd zsugorfóliába csomagolva, autoradiografáló kazettában röntgen filmet helyeztünk rá. A filmet 5-30 perc exponálás után hívtuk elő.

3.1.5. RT-PCR

Az *EcR* izoformák kifejeződését az egyedfejlődés különböző stádiumaiban, illetve az általunk azonosított P-inszerciós *EcR* mutánsokban RT-PCR módszerrel vizsgáltuk.

Totál RNS izolálást Trizol (GIBCO BRL) reagenssel, a gyártók útmutatása alapján végeztük 10-10 mg szövetből kiindulva.

cDNS szintézishez 5 µg totál RNS-t használtunk. Az 5 µg RNS-t 5µl 50µg/ml koncentrációjú random hexamerrel (pd(N)₆ Amersham Pharmacia Biotech) mértünk össze és az elegyet dH₂O-val 10µl-re egészítettük ki. Ezután 70 °C-os vízfürdőben inkubáltuk 10 percig, majd 5 percre jégre raktuk. Összemértünk egy másik eppendorf csőben 4µl 5x koncentrációjú puffert (SIGMA), 1µl 10mM koncentrációjú dNTP keveréket (SIGMA), 2 µl 0,1 M koncentrációjú DTT-t, 0,5 µl RN-áz inhibitor (Amersham Pharmacia Biotech), 1µl 200U/µl koncentrációjú M-MLV Reverse Transzkriptázt (SIGMA) és 1,5µl dH₂O-t, és ehhez adtuk hozzá az RNS-t és a primert tartalmazó keveréket. A mintát ezután 37 °C-on 1 óráig inkubáltuk, majd 5 percig 70 °C-on inaktiváltuk a reverz transzkriptáz enzimet. Az így elkészült egyszálú cDNS preparátumot -20 °C-on tároltuk.

A PCR reakciókat 25 µl térfogatban hajtottuk végre a következő komponensek felhasználásával: 2,5 µl 10 x koncentrációjú puffer, 2 µl 25 mM koncentrációjú MgCl₂, 2 µl 2,5 mM koncentrációjú dNTP, 1-1 µl 5 µM koncentrációjú primer, 1 U Taq DNS polimeráz (Fermentas), templát cDNS.

A PCR program minden primer pár esetében ugyanaz volt, mely a következő lépésekből állt: 1. 95 °C-on 5 perc, 2. 95 °C-on 30 másodperc, 3. 55 °C-on 30 másodperc, 4. 72 °C-on 1 perc, 2.-4. lépések 30 x ismételve, 5. 72 °C-on 5 perc.

A reakcióelegyekből 15 µl-t futtattunk meg 1,5 %-os agaróz gélen.

Egy RT-PCR kísérletben használt cDNS minták koncentrációját az *rpL17A* riboszómális fehérje génre specifikus primerpárral (L17AF-L17AR) egymáshoz igazítottuk. A mintákat addig hígítottuk, míg a cDNS mennyiség felére csökkentése láthatóan kevesebb PCR terméket eredményezett, és ebben a koncentráció tartományban úgy választottuk meg a PCR reakciókhoz használt templát mennyiségeket, hogy az egyes minták kb. azonos intenzitású terméket adjanak. Ezután minden más primer párral végzett kísérletben megtartottuk a templát mennyiségek ily módon beállított egymáshoz viszonyított arányát.

A kísérletekben alkalmazott primerek:

primer1 (<i>EcRA</i> első exonjában előrefelé):	cgcaaatacagagtgtcaaa
primer2 (<i>EcRA</i> harmadik exonjában visszafelé):	tttgccgtaggactgtaag
primer3 (<i>EcRC</i> második exonjában előrefelé):	actgtggggcaaaactgtg
primer4 (<i>EcRBI</i> második exonjában előrefelé):	gggaatgggtattctcacc
primer5 (első közös <i>EcR</i> exonban visszafelé):	aaccaggcacagctcctctt
primer6 (<i>EcRB</i> első exonban előrefelé):	gcccattggatacttgtggat
primer13 (<i>EcRA</i> második exonjában előrefelé):	gcagcaaccacaactccaa
primer14 (miniwhite harmadik exonjában visszafelé):	gtgtgctgacatttgctga
primer15 (<i>EcRA</i> második exonban előrefelé):	ggataaactaaggccgacac
L17AF (<i>rpL17A</i> gén második exonjában előrefelé):	gtgatgaactgtgccgacaa
L17AR (<i>rpL17A</i> gén harmadik exonjában visszafelé):	ccttcatttcgcccttgttg

3.1.6. DNS nukleotid sorrend meghatározás

A DNS bázissorrend meghatározást az MTA SZBK DNS szekvenáló szolgáltató egysége végezte. Templátként kettős szálú Plazmid DNS-t vagy gélből tisztított PCR fragmentet használtak.

A plazmid DNS preparátumokat JETSTAR plazmid izoláló kittel (Genomed GmbH) állítottunk elő.

A PCR fragmentek izolálását DEAE cellulóz membránra történő elektroforézissel végeztük (Maniatis, T., Sambrook, J., and Fritsch, E. F., 1989).

3.2. Citológiai módszerek

3.2.1. Lárvális nyálmirigy óriáskromoszóma in situ hibridizáció

A P-elemek helyzetét a letális *P(Torok és mtsai, 1993)*-inszerciós EcR allélekben óriáskromoszóma in situ hibridizációval vizsgáltuk. Hibridizációs próbának digoxigenin jelölt *pP{lacW}* plazmid DNS-t (Bier és mtsai, 1989) használtunk. A próba készítéshez, és a hibridizációs jel detektálásához DIG DNS jelölő és DIG nukleinsav detektáló (NBT/BCIP) kitet (Boehringer GmbH, Németország) használtunk.

3.2.1.1. Kromoszómapreparátum készítés

Jól táplált *EcR^P/BcGla* vándorló 3. stádiumos lárvák nyálmirigyét 0.7 %-os NaCl oldatban kiboncoltuk, majd 45 %-os ecetsavba merítettük 1 percre. Ezután a nyálmirigyet pormentes, szilikonizált fedőlemezre cseppentett 1:2:3 fixáló oldatba (1 rész tejsav, 2 rész víz, 3 rész ecetsav) raktuk. 3 perc fixálás után a fedőlemezt felemeltük, egy tiszta, előkezeletlen tárgylemezt a folyadékcsapphoz érintve, majd a fedőlemez kopogtatásával és megnyomásával szétterítettük a kromoszómákat. Fáziskontraszt mikroszkópban való ellenőrzés után a jónak ítélt lemezeket éjszakán át 4 °C-on tároltuk. (Ez a lépés tovább lapítja a kromoszómákat.) Ezután a lemezeket folyékony nitrogénbe mártottuk, és egy éles pengével lepattintottuk a fedőlemezeket. A tárgylemezekre tapadt kromoszómákat -70 °C-ra előhűtött 96 %-os alkoholba helyeztük, és megvártuk, amíg szobahőmérsékletre melegszenek, majd levegőn szárítottuk. A jó minőségben megmaradt kromoszómákat szobahőmérsékleten tároltuk

felhasználásig. (A kromoszómák pozícióját gyémántceruzával megjelöltük a lemez hátoldalán.)

3.2.1.2. Előkezelés és denaturálás

A lemezeket 65 °C-on 30 percig, majd szobahőmérsékleten 10 percig inkubáltuk 2 x SSC-ben (0.3 M NaCl, 0.03 M Na-citrát). Ezután a 70 mM NaOH-ban 2 percig inkubálva denaturáltuk a kromoszómákat. A lemezeket 2 x SSC-be mártottuk, majd 5 percig 70 %-os és 2 x 5 percig 96 %-os etanolban dehidratáltuk a kromoszómákat. A lemezeket levegőn szárítottuk és még aznap felhasználtuk.

3.2.1.3. Hibridizálás

1 lemezhez 10 µl hibridizáló oldatot használtunk. Ez 5 µl deionizált formamidból és 5 µl 2 x hibridizációs carrier mix-ből állt. (A 2 x hibridizációs carrier mix összetétele: 8 x SSC, 2 x Denhardt's, 20 % dextrán szulfát, 0.8 % sonicated salmon sperm DNS.)

Ehhez adtuk a megfelelő mennyiségű digoxigenin jelölt próbát, ezután az oldat 10 perces 75 °C-on történő inkubálásával denaturáltuk a próbát, majd parafilmből készült „fedőlemeze” pipettáztuk a hibridizáló oldat 10 µl-ét, és az oldat buborékmentes szétterülésre ügyelve felszedtük a „fedőlemezt” a megfelelő kromoszómát tartalmazó tárgylemezzel. A lemezeket 37 °C-on inkubáltuk nedves kamrában éjszakán át.

3.2.1.4. Előhívás

A „fedőlemezeket” a lemezek 2 x SSC-be mártásával el távolítottuk, és a kromoszómákat 3 x 20 percig 53 °C-on inkubáltuk, előmelegített 2 x SSC-ben. Ezután 2 x 5 percig PBS-ben, majd 2 percig 0.1 % Triton X-100 tartalmú PBS-ben mostuk a preparátumokat. Ezt követően Boehringer 1-es pufferben mostuk a kromoszómákat, majd 100 µl Boehringer 1-es pufferben 500 x-osra hígított alkalikus foszfáttal konjugált anti DIG ellenanyag (kit) oldatával borított lemezeket, parafilmmel lefedtük, és nedves kamrában 1 órát inkubáltuk 37 °C-on. Ezután 2 x 15 percig mostuk Boehringer 1-es pufferben, majd 2 percig

Boehringer 3-as pufferben. 100 µl festőoldattal (ml-enként 4.5 µl NBT (Kit) és 3.5 µl X-foszfát oldattal (Kit) kiegészített Puffer3), parafilmmel lefedve sötét helyen történő 15-30 perces inkubálással hívtuk elő a hibridizációs jelet. Reakciót Boehringer 4-es pufferben állítottuk le. A kromoszómákat, ha szükséges volt, megfestettük orcein oldattal. A preparátumokat fáziskontraszt mikroszkóppal értékeltük ki.

3.2.2. A mutáns szövetek mikroszkópos vizsgálata

A fejlődésben megrekedt *EcR^P/EcR^{554fs}* lárvákat illetve kontrollként vad típusú fehér bábokat, valamint kéttő és négy órás előbábokat PBS-ben (130 mM NaCl, 7 mM Na₂HPO₄, 3 mM NaH₂PO₄, pH=7.5) boncoltuk. A szöveteket 15 percig fixáló oldatban (2 % glutáraldehid PBS-ben) inkubáltuk, majd 2 x 5 perces PBS-sel történt mosás után a szöveteket mikroszkóp tárgylemezen 80 %-os glicerinben szétterítve fénymikroszkóppal vizsgáltuk. Minden fenotípusból 5-10 db állatot vizsgáltunk.

A középbél DAPI festéséhez a PBS-ben kiboncolt szöveteket 30 percig fixáltuk (4% paraformaldehid PBS-ben), 3 x 5 perces PBS-sel történt mosás után 10 percig festettük (1 mg/ml DAPI PBS-ben), majd 3 x 5 perces PBS-sel történt mosás után a megfestett szöveteket 80 %-os glicerinben felpreparálva, UV mikroszkópban vizsgáltuk.

3.3. *Drosophila* törzsekkel végzett kísérletek

A *Drosophila* törzsek fenntartásához és a keresztezésekhez kukoricaliszt, élesztő, cukor, agar összetevőkből álló standard táptalajt használtunk, melyet melasszal egészítettünk ki.

3.3.1. A letális P-inszerciós *EcR* allélek azonosítása és fentípus vizsgálata

3.3.1.1. P-inszerciós *EcR* allélek azonosítása

A második kromoszómás letális *P{lacW}*-inszerciós mutáns gyűjtemény szűréséhez és a mutáns törzsek osztályozásához végzett komplementációs vizsgálatokhoz a

Df(2R)nap2/Gla, *Df(2R)nap4/Gla*, *Df(2R)nap9/Gla*, *Df(2R)nap14/CyO*, *Df(2R)nap20B/CyO*, *Df(2R)bw{vDe2L}Cy{R}/Gla* deléciós törzseket használtuk. A gyűjteményben szereplő mutánsokat (*P{lacW}/CyO*) kereszteztük a deléciós törzsekkel (*Df(2R)/CyO* vagy *Gla*). Az utódok között a balanszer kromoszómákat nem tartalmazó (vad fenotípusú) kategória megléte vagy hiánya mutatta a komplementációt (az adott P-inszerciós mutánsban a letális mutáció a deficiencia területén kívül található), vagy a komplementáció hiányát (az adott P-inszerciós mutánsban a letális mutáció a deficiencia területén található). A mutáns törzsek komplementációs csoportokba állítását a törzsek egymással történő keresztezésével, ugyanezen elv szerint végeztük. Az *EcR* alléleket az *EcR^{554fs}/SM5* mutáns törzsszel történő keresztezéssel, szintén a komplementáció hiánya alapján választottuk ki.

3.3.1.2. Letális fázis meghatározás

A letális P-inszerciós allélek (*EcR^P*) letális fázisát az *EcR^{554fs}* alléllal heterozigóta formában (*EcR^P/EcR^{554fs}*) vizsgáltuk. Az *EcR^P/BcGla* x *EcR^{554fs}/BcGla* keresztezésből származó késő L3 stádiumos *Bc* fenotípusú (*EcR^P/BcGla* és *EcR^{554fs}/BcGla*) és *Bc⁺* fenotípusú (*EcR^P/EcR^{554fs}*) lárvákat megszámláltuk, majd a *Bc⁺* fenotípusúakat tovább tenyésztve vizsgáltuk, hogy milyen fejlődési állapotban pusztulnak el. (A *P-5738* mutánsok bebábozódtak, ezért ezzel a törzsszel elvégeztük a kísérletet úgy is, hogy a báb állapotban számláltuk meg a *Bc* illetve *Bc⁺* fenotípusú utódokat.) A *Bc⁺* utódok számát a *Bc* utódok számának feléhez viszonyítva megállapíthattuk, hogy a *Bc* (*EcR^P/EcR^{554fs}*) utódok mindegyike eléri-e a vizsgált fejlődési állapotot (L3 vége vagy a *P-5738* allél esetén a báb állapot). Vad típusú kontrollként az *EcR^{554fs}/BcGla* x *+(OreR)/+(OreR)* keresztezés eredményét használtuk, ahol a *Bc* utódok számát az összes *Bc⁺* utód számához viszonyítottuk. Minden esetben három párhuzamos keresztezés eredményének átlagából vontunk le következtetést.

A *P+12319* allél vizsgálata során nem kaptunk L3 stádiumos *Bc⁺* utódokat, vagyis a *P+12319* mutánsok az egyedfejlődés korábbi fázisában pusztulnak el, ezért ennek a mutánsnak a letális fázisát megvizsgáltuk az egyedfejlődés korábbi állapotaiban is. A *P+12319/+(OreR)* x *EcR^{554fs}/+(OreR)* keresztezésből két párhuzamos kísérletben 300 db illetve 320 db petét gyűjtöttünk, majd ezeket tovább tenyésztve, megszámláltuk a ki nem kelő petéket illetve az első két lárvastádiumban elpusztuló állatokat. Mivel a *P+12319/+(OreR)*, *EcR^{554fs}/+(OreR)* és a *+(OreR)/+(OreR)* utódkategóriák egyike sem letális, az elpusztuló egyedeknek az összes egyed 1/4 részét kitevő *P+12319/EcR^{554fs}* kategóriába kell tartozni.

Ebből adódóan egy adott fejlődési állapotban elpusztuló egyedek számát az összes egyed $\frac{1}{4}$ részéhez viszonyítva adtuk meg.

A bebábozódó *P-5738* allél báb állapotra vonatkozó letális fázisát is meghatároztuk mind homozigóta (*P-5738/P-5738*), mind az *EcR^{554fs}* alléllal szemben heterozigóta (*P-5738/EcR^{554fs}*) állapotban. A *P-5738/BcGla* x *P-5738/BcGla* illetve a *P-5738/BcGla* x *EcR^{554fs}/BcGla* keresztezésekből származó ismert számú *Bc⁺* (*P-5738/P-5738* illetve *P-5738/EcR^{554fs}*) L3 stádiumos lárvát tovább tenyésztettünk, és azt vizsgáltuk, hogy a báb állapot különböző stádiumaiban hány %-uk pusztul el. Négy párhuzamos kísérletben 52 db, 44 db, 45 db és 56 db *P-5738/P-5738* egyedet, és három párhuzamos kísérletben 29 db, 24 db és 38 db *P-5738/EcR^{554fs}* egyedet vizsgáltunk meg.

3.3.2. A letális P-inszerciós *EcR* mutánsok menekítése a különböző *EcR* izoformákkal

A kísérletekben a *hsEcRA^{60.19}*, a *hsEcRBI*, és a *hsEcRB2^{30.1}* transzgéneket hordozó törzseket használtuk (Bender és mtsai, 1997).

Az *EcR^{554fs}/BcGla* ; *hsEcR/hsEcR* x *EcR^P/BcGla* ; +/+ keresztezésből származó *Bc⁺* (*EcR^{554fs}/EcR^P* ; *hsEcR/+*) vándorló L3 utódokat hősokkoltunk egy alkalommal 30 percig 37 °C-on, majd 25 °C-on tenyésztve őket tovább, meghatároztuk, hogy hány %-uk éri el a kifejlett állapotot. Minden mutáns esetében több mint 100 db hősokkolt L3 lárvát vizsgáltunk. Kontrollként hősokk nélkül is elvégeztük a kísérletet szintén 100 db fölötti egyedszámmal.

A *P-40* allél esetében megvizsgáltuk, hogy az előzőleg ismertetettel megegyező kísérletekben a *EcR^{554fs}/P-40*; *hsEcR/+* utódok a báb állapot mely stádiumában pusztulnak el. A *hsEcRA* transzgénnel 85 db, a *hsEcRBI* transzgénnel 62 db a *hsEcRB2* transzgénnel 32 db L3 *EcR^{554fs}/EcR^P*; *hsEcR/+* egyedet vizsgáltunk meg.

3.3.3. Az *EcRA* fehérje termelését megakadályozó allélek fenotípus vizsgálata

3.3.3.1. Életképesség vizsgálat

Meghatároztuk a *l(2)06410/BcGla* x *EcR^{554fs}/BcGla*, az *EP(2)2509/EP(2)2509* x *EcR^{554fs}/BcGla* valamint az *+(OreR)/(OreR)* x *EcR^{554fs}/BcGla* (vad típusú kontroll)

keresztezésekből származó Bc^+Gla^+ és $BcGla$ fenotípusú utódok számát. Mindhárom esetben három-három párhuzamos keresztezést végeztünk. Az $l(2)06410$ allél esetében a Bc^+Gla^+ utódok számát a $BcGla$ utódok $\frac{1}{2}$ részéhez, míg az $EP(2)2509$ allél és a $+(OreR)$ vad típusú kontroll esetében az összes $BcGla$ utód számához viszonyítottuk.

3.3.3.2. Fertilitás vizsgálat

1-1 db $l(2)06410/EP(2)2509$, $l(2)06410/EcR^{554f}$ és $EP(2)2509/EcR^{554fs}$ genotípusú, valamint (kontrollként) $EcR^{554fs}/+(OreR)$, $l(2)06410/+(OreR)$ és $EP(2)2509/+(OreR)$ genotípusú nőtényt 1-1 db vad típusú ($OreR$) hímmel kereszteztünk, és négy napon keresztül megszámoltuk a naponta lerakott, illetve a peterakás után 26-28 óra múlva ki nem kelt petéket. Minden vizsgált genotípusból 8-8 párhuzamos keresztezést végeztünk.

Az EcRA fehérje hiányának a hím fertilitásra gyakorolt hatását az előzőekhez hasonlóan vizsgáltuk, azzal a különbséggel, hogy ebben az esetben 1-1 db $l(2)06410/EP(2)2509$, $l(2)06410/EcR^{554f}$ és $EP(2)2509/EcR^{554fs}$ genotípusú, valamint (kontrollként) $EcR^{554fs}/+(OreR)$, $l(2)06410/+(OreR)$ és $EP(2)2509/+(OreR)$ genotípusú hímeket kereszteztünk 1-1 db vad típusú ($OreR$) nőténnyel. Ebben az esetben is 8-8 párhuzamos keresztezés eredményének átlagából vontunk le következtetést.

4. EREDMÉNYEK

4.1. *Drosophila EcR* izoformák

4.1.1. Az *EcR* régióban található EST-k egy új *EcRA* fehérjét kódoló *EcR* izoformát (*EcRC*) jelölnek ki

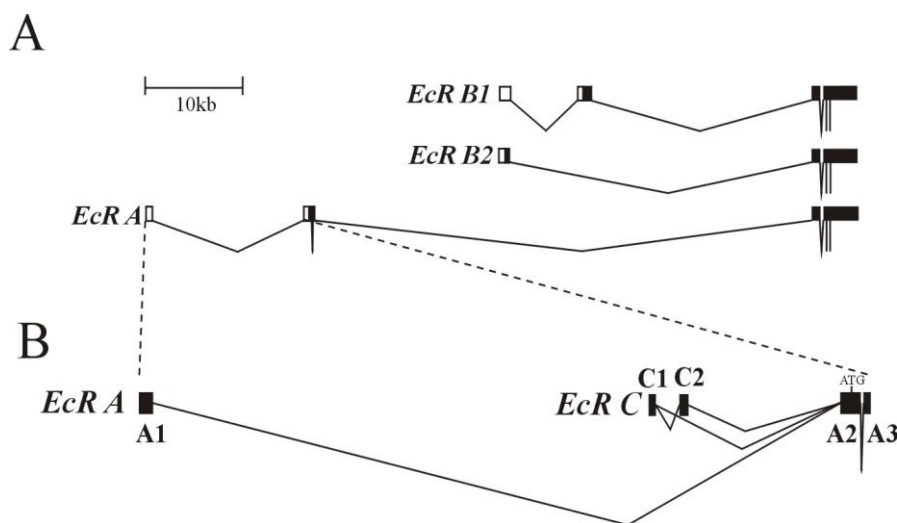
A *Drosophila EcR* gén hatalmas mérete (mintegy 80 kb), és bonyolult szerkezete alapján valószínűsíthető volt, hogy az eddig megismert *EcRA*, *EcRB1* és *EcRB2* izoformákon (Talbot és mtsai, 1993) kívül további, még nem azonosított *EcR* izoformák is léteznek. Ilyen izoformák azonosítására jó lehetőséget kínált a Berkley *Drosophila* Genom Project (BDGP) által létrehozott EST (expressed sequence tag) gyűjtemény, mely nagy mennyiségű adatot szolgáltat a *Drosophila* gének kifejeződéséről. Az EST adatbázisban szereplő nukleotid szekvenciák nagy gondossággal előállított cDNS könyvtárak klónjairól származnak, így jó eséllyel reprezentálják a génekről keletkező mRNS-ek döntő többségét.

Új *EcR* izoformák azonosítására, szekvencia összehasonlítással (BLAST) kiválogattuk az EST adatbázisból az ismert *EcR* izoformák által lefedett genomi régióban található EST-eket, majd megvizsgáltuk, hogy találunk-e közöttük olyanokat, melyek nem felelnek meg egyik korábban azonosított *EcR* izoformának sem.

Négy, embrióból származó EST reprezentálja az *EcRB* izoformák első exonját (Clot13888: RE33854 5', RE34511 5', RE06878 5' és az RE42102 5'). Az ezek által kijelölt *EcRB* transzkripció start pont azonos azzal, amit Talbot és munkatársai állapítottak meg.

Két olyan 5' EST található az adatbázisban, melyek a közös *EcR* exonokra illeszkednek, de nem érintenek izoforma specifikus exonokat (LD18219 5', LP01848 5').

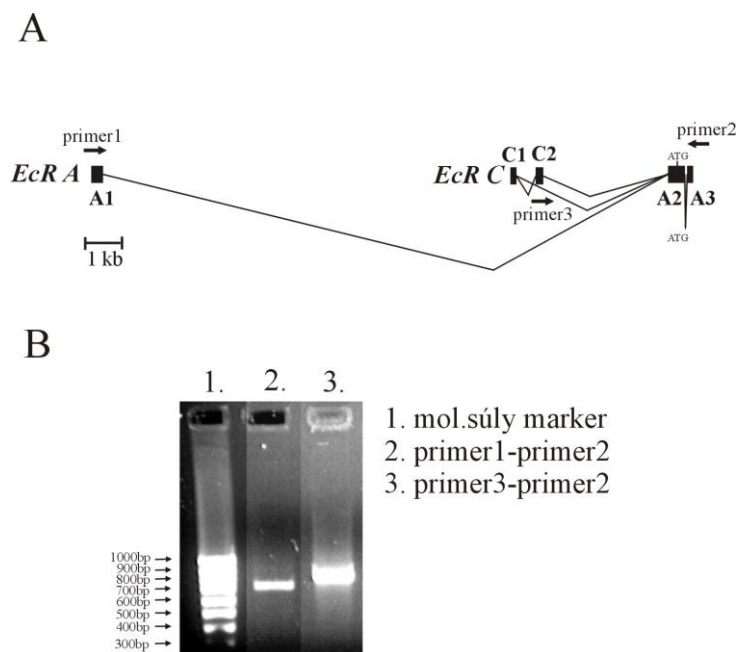
Az *EcRA* izoforma első exonjával átfedő EST-t nem találtunk, azonban 31db olyan 5' EST létezik (Clot 5540), mely az *EcRA* izoforma 2. vagy 3. exonját tartalmazza. Ezek mindegyike, az adult fejből izolált HL01604 5' kivételével, embrionális cDNS könyvtárból származik. Közülük kettő (LD56649 5' és LD47647 5') az *EcRA* 3. exonjában kezdődik, a többi pedig egy új *EcR* izoformát (*EcRC*) jelöl ki, amely az *EcRA* izoforma első és második exonja között elhelyezkedő kéttő, az eddigi izoformákban nem szereplő, exonnal kezdődik és az *EcRA* 2. exonjával folytatódik. A 29 *EcRC* izoformának megfelelő EST közül egy (LD33832 5'), kivételesen csak az első *EcRC* exont tartalmazza, ami közvetlenül csatlakozik az *EcRA* 2. exonjához. Ezen EST létezése az *EcRC* izoformán belüli alternatív intron kivágódásra utal (**1. ábra**).



1. ábra. Az *EcR* gén szerkezete.

Az A részben Talbot és munkatársai által korábban azonosított három *EcR* izoforma exon intron szerkezete látható. Az exonok 5' nem transzlálódó régióját üres téglalapok jelzik. A B rész az *EcR A* specifikus exonokat tartalmazó régiót mutatja kinagyítva. A1, A2 és A3 jelzéssel a korábról ismert *EcR A* izoformának megfelelő exonokat láttuk el. A BDGP EST adatbázis segítségével azonosított *EcR C* izoforma specifikus exonjai C1 és C2 jelzéssel szerepelnek. Az A2 exonban feltüntettük a transzláció kezdőpontjának megfelelő ATG kódot.

RT-PCR kísérletekkel melyekben az *EcR A* izoforma első, illetve az *EcR C* izoforma második exonjába tervezett primereket (rendre primer1 és primer3) használtunk szemben az *EcR A* izoforma harmadik exonjára specifikus primerrel (primer2), kimutattuk, hogy adult nőstényekben az *EcR A* és az *EcR C* izoformának megfelelő mRNS is képződik. (2. ábra).



2. ábra. Az *EcR A* és az *EcR C* izoformák kimutatása RT-PCR módszerrel.

Az A részben az *EcR A* és az *EcR C* izoformák specifikus exonjait tartalmazó genomi régió látható. A1, A2, A3 az *EcR A*, a C1, C2 az *EcR C* izoforma exonjait jelöli. Az A2 exonban feltüntettük a transzláció kezdőpontjának megfelelő ATG kódot. Az RT-PCR kísérletekben használt primerek helyzetét nyilak mutatják.

Az ábra **B** részében az adult nőstényeken végzett RT-PCR eredménye látható. Az **1.** minta mol. súly létra, a **2.** minta az 1-2 primer párral kapott (*EcRA* izoformának megfelelő) termék, a **3.** minta a 3-4 primer párral kapott (*EcRC* izoformának megfelelő) termék.

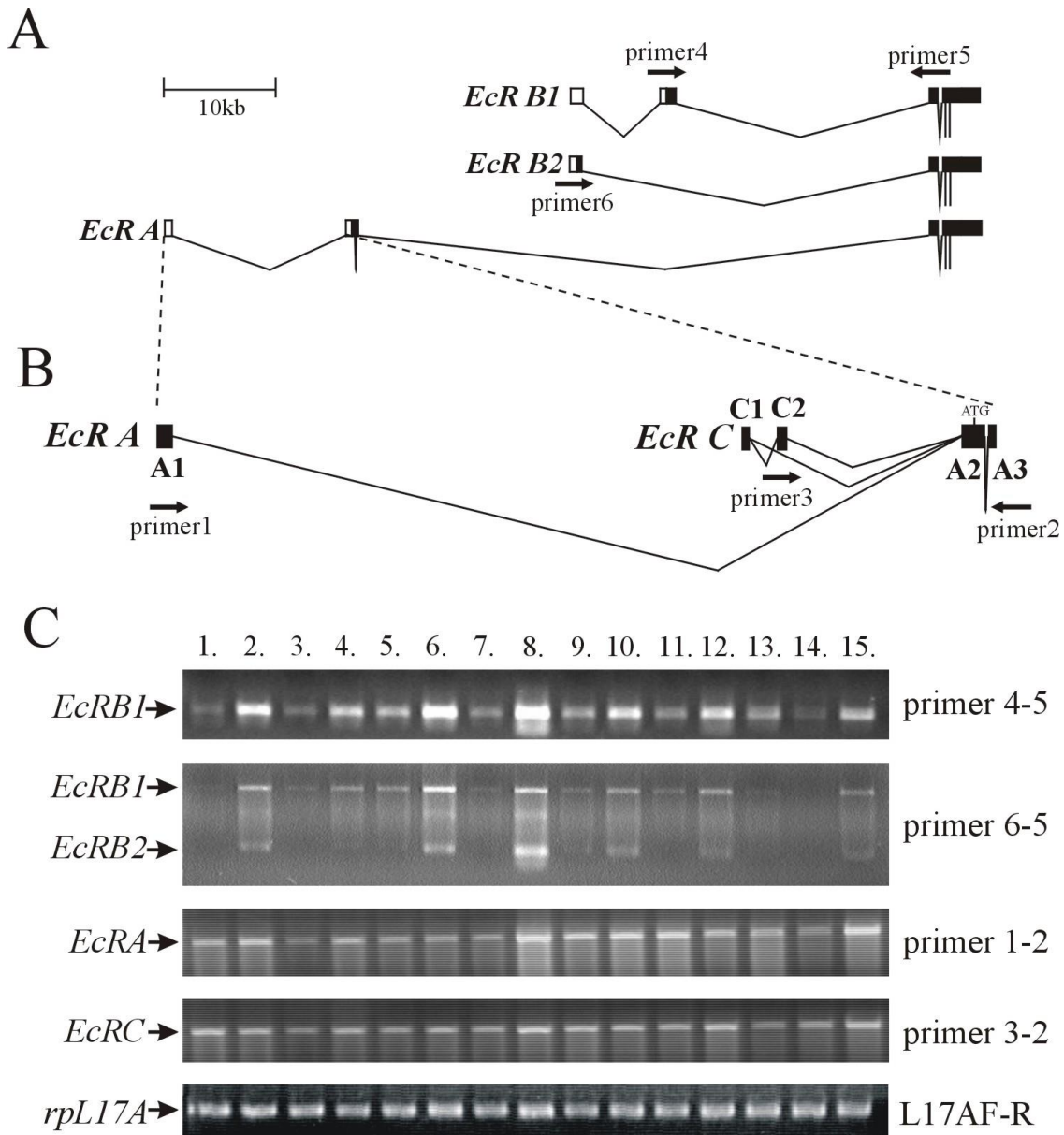
Az 1-2 primer párral egyetlen, az *EcRA* izoformának megfelelő terméket tudtunk kimutatni (**2. ábra**), vagyis az *EcRC* exonok nem vesznek részt az *EcRA* első exonját tartalmazó érett mRNS-ek képzésében. Úgy tűnik tehát, hogy az *EcRA* és az *EcRC* izoformák saját elkülönült transzkripciós kezdőponttal és promóter régióval rendelkeznek, átírásuk minden bizonnyal önállóan szabályozott.

Az *EcRC* első két exonja, hasonlóan az *EcRA* első exonjához, nem kódol fehérjét, csupán a mRNS 5' nem transzlálódó régióját alkotja. A transzláció az *EcRA* és az *EcRC* izoforma esetén ugyanannak, az *EcRA* 2. exonjában kezdődik, tehát a két izoforma ugyanazt a fehérjét (*EcRA*) eredményezi.

4.1.2. Az *EcR* izoformák kifejeződése a *Drosophila* egyedfejlődése során

Az *EcRC* izoforma kimutatásával felmerült a kérdés, vajon az újonnan megismert izoforma kifejeződési mintázata eltérő-e a korábban azonosított *EcR* izoformákétól, illetve az átíródása korlátozódik-e bizonyos fejlődési állapotokra. Az irodalomból csak az *EcRA* és az *EcRBI* izoformák kifejeződéséről vannak ismereteink (Talbot és mtsai, 1993). Az *EcRB2* izoforma specifikus kimutatása nem volt lehetséges sem northern hibridizációval (nem létezik *EcRB2* specifikus exon), sem western blot technikával (*EcRB2* specifikus ellenanyagot nem tudtak előállítani).

Az RT-PCR módszer lehetőséget nyújtott arra, hogy külön-külön kimutassuk mind a négy *EcR* izoformának megfelelő mRNS-eket, így vizsgálni tudtuk az egyes izoformák kifejeződését az egyedfejlődés során (**3. ábra**). Az RT-PCR technika pontos mennyiségi meghatározást nem tesz lehetővé, de a templát koncentrációk beállításával el tudtuk érni, hogy a PCR termékek mennyisége tükrözze a mintákban jelenlévő templátként szolgáló cDNS-ek mennyiségét. Az *EcRBI* és *EcRB2* izoformák ugyanolyan mintázat szerint fejeződnek ki az egyedfejlődés során. Ez nem meglepő, hiszen ez a két izoforma átírása azonos transzkripciós kezdőpontról indul, így minden bizonnyal azonos szabályozás alatt állnak. Az általunk tapasztalt kifejeződési mintázat megfelel annak melyet Talbot és munkatársai northern-hibridizációval mutattak ki (Talbot és mtsai, 1993). Az *EcRA* és az *EcRC* izoforma is kifejeződik minden vizsgált fejlődési állapotban. A kifejeződési mintázatuk hasonló. Különbséget két fejlődési állapotban találtunk, az adult nőstények petefészkében és a korai embriókban, az *EcRC* izoforma nagyobb mennyiségben van jelen, mint az *EcRA*.



3. ábra. Az *EcR* izoformák kifejeződése az egyedfejlődés során

Az ábra A része Talbot és munkatársai által azonosított három *EcR* izoforma exon intron szerkezetét mutatja. Az exonok nem transzlálódó 5' részét üres téglalapok jelölik. Az RT-PCR-ben használt primereket nyilakkal jelöltük.

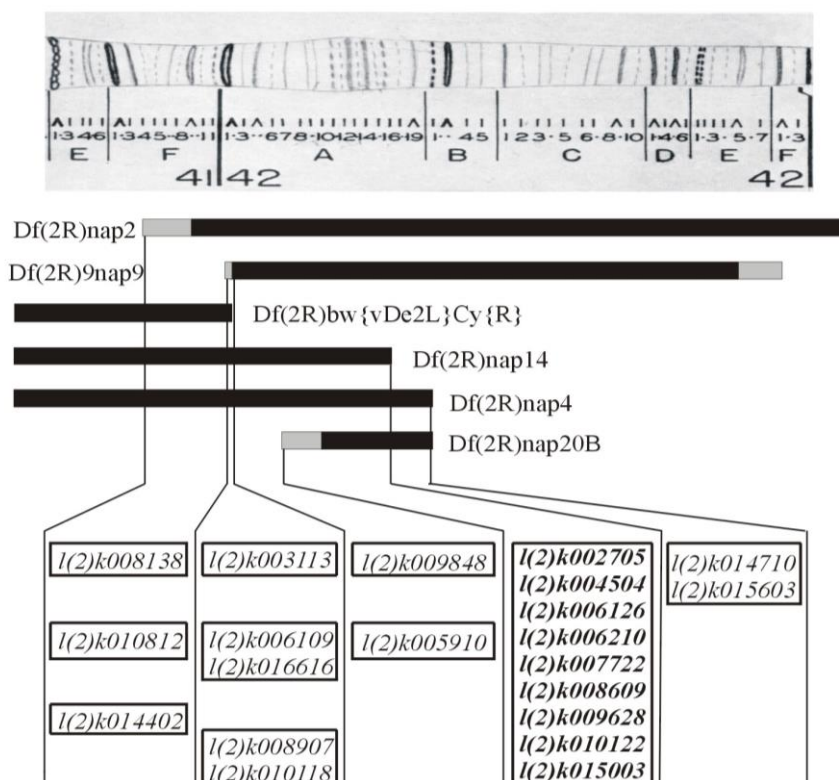
A B részben az *EcRA* és az *EcRC* izoformák specifikus exonjait tartalmazó régió látható kinagyítva. A1, A2, A3 az *EcRA*, a C1, C2 az *EcRC* izoforma exonjait jelöli. Az A2 exonban feltüntettük a transzláció kezdőpontjának megfelelő ATG kódot. Az RT-PCR kísérletekben használt primerek helyzetét itt is nyilak mutatják.

A C részben az egyedfejlődés során az egyes *EcR* izoformák kifejeződésére vonatkozó RT-PCR kísérletek eredménye látható. Az egyes panelek mellett feltüntettük az adott kísérletben használt primerek azonosítóját. Az egyes fejlődési állapotoknak megfelelő templát (cDNS) koncentrációt *rpL17A* riboszómális fehérje specifikus primer párral normalizáltuk. A PCR reakciókban használt templát koncentrációk szemikvantitatív értékelést tettek lehetővé. A minták sorrendje: **1.** 0-3 órás embrió, **2.** 0-24 órás embrió, **3.** L1, **4.** L2, **5.** korai L3, **6.** vándorló L3, **7.** P1, **8.** P5-P7, **9.** P10-P11, **10.** P14-P15, **11.** adult nőstény, **12.** adult hím, **13.** adult nőstény petefészkek nélkül, **14.** adult petefészkek, **15.** adult nőstény fej.

4.2. Letális P-elem inszerciós *EcR* allélek

4.2.1. Letális P-elem inszerciós *EcR* (*EcR^P*) allélek azonosítása

Új *EcR* allélek azonosítására második kromoszómás letális *P*-elem inszerciós gyűjteményben (Török és mtsai, 1993) kerestünk az *EcR* gén citológiai pozícióját (42A) eltávolító *Df(2R)nap2* és *Df(2R)nap4* deléciókat nem komplementáló mutáns vonalakat. A szűrés eredményeképpen 22 mutánst azonosítottunk a *Df(2R)nap2* és a *Df(2R)nap4* deléciók egymással átfedő régiójában. A mutánsokat ezután további deléciók segítségével öt különböző csoportba osztottuk, majd egymással keresztezve őket kilenc komplementációs csoportot állítottunk fel. *EcR* alléleknek a *Df(2R)nap20B* deléció proximális töréspontja és a *Df(2R)nap14* deléció disztális töréspontja közé eső legnagyobb tagszámú komplementációs csoport tagjai bizonyultak, mivel nem komplementálták az *EcR^{M554fs}* és az *EcR^{C300Y}* amorf *EcR* alléleket (4. ábra).



4. ábra. Letális P- inszerciós *EcR* allélek azonosítása.

Az ábrán feltüntettük a letális P-inszerciós mutáns gyűjtemény szűréséhez, és a mutáns törzsek csoportosításához használt deficienciákat. A szűréssel azonosított törzsek közül az egy komplementációs csoportba tartozók bekeretezve, az *EcR* allélek vastag betűvel szerepelnek.

Az ily módon azonosított *EcR* mutánsokban nyálmirigy óriás kromoszóma *in situ* hibridizációval meghatároztuk a P-inszerciók helyzetét. Próbának a mutánsok által hordozott *P{lacW}* mesterséges P-elem DNS-ét használtuk. Kilenc törzs esetében kaptunk hibridizációs jelet az *EcR* gén pozíciójának megfelelő 42A régióban, ezek közül háromban nem csak egy jel volt látható. Az *l(2)002705* mutánsban a 35D és a 47B, az *l(2)k009618* esetében a 21A, az *l(2)k 0150603* esetén a 42B1-2 citológiai helyeken is ki tudtunk mutatni P-inszerciót. Az *l(2)k016818* mutánsban a 27D régióban lehetett egyetlen hibridizációs szignált megfigyelni. Ez a mutáns a 42A pozícióban nem hordozott detektálható P-elemet, tehát az *EcR* gén mutációját nem P-elem jelenléte okozza. A P-elem mobilizálással végzett mutagenézis kísérletek során gyakori esemény a P-inszerciótól független háttér mutációk megjelenése. A háttér mutációk kialakulása a P-elem többszöri áthelyeződésével magyarázható, mivel a P-elem kivágódása során gyakran keletkeznek kromoszóma átrendeződések, elsősorban deléciók. Az *l(2)k016818* törzset a P-inszerció hiánya miatt a továbbiakban nem vizsgáltuk.

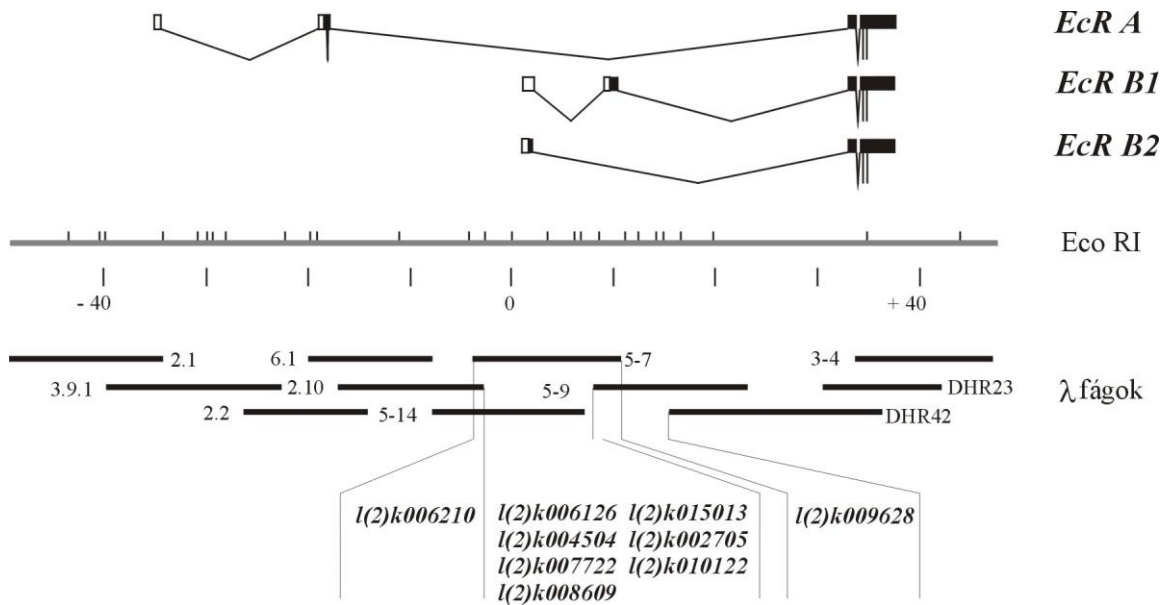
A P-elemet újra mobilizálva mind a kilenc, az *l(2)k016818* kizárása után megmaradt allélból kiindulva sikerült életképes, P-elem vesztett revertánsokat (a P-elem pontos kivágódásának eredményeként) előállítanunk. Evvel igazoltuk, hogy a mutánsokban tapasztalt letális fenotípus valóban a P-inszerció következménye.

4.2.2. A letális P-inszerciók az *EcRB* izoformák környezetében található

A mutáns törzsekben a P-inszerciók helyének pontos meghatározásához rendelkezésünkre álltak az *EcR* gén klónozásakor az ún. „genomikus sétával” azonosított, a gént és kromoszómális környezetét tartalmazó λ fág klónok (Talbot és mtsai, 1993) (**5. ábra**). Emellett nagy segítséget jelentett, hogy a mutánsok előállításához használt *P{lacW}* elem szerkezete (**6. ábra**) lehetővé tette a P-inszercióval szomszédos genomi DNS szakaszok plazmid menekítéssel történő klónozását. A plazmid menekítés eredményeként az *l(2)k002705* törzsben három, az *l(2)k006126* törzsben kettő, az *l(2)k008604* törzsben négy, az *l(2)k009628* törzsben három, az *l(2)k010122* törzsben kettő és a *l(2)k015003* törzsben négy különböző méretű, és eltérő fizikai térképpel rendelkező plazmidot kaptunk. Csupán az *l(2)k004504* és az *l(2)k006210* törzsből nyertünk vissza csak egyféle plazmidot. Az egy törzsből származó, egymástól különböző plazmidok nyilvánvalóan azt mutatják, hogy az illető mutáns több inszerciót hordoz.

Első lépésben southern hibridizációval vizsgáltuk meg a plazmid menekítéssel nyert genomikus DNS szakaszokat az *EcR* gén részeit tartalmazó λ fág klónokat használva

hibridizációs próbának. Ezzel a módszerrel minden törzsben sikerült egy P-inszerciót elhelyeznünk az *EcR* gén területén (**5. ábra**). Érdekes módon az inszerciók kivétel nélkül az *EcRB* izoformák környezetébe lokalizálódtak.



5. ábra. A letális P-inszerciók lokalizálása az *EcR* régióban.

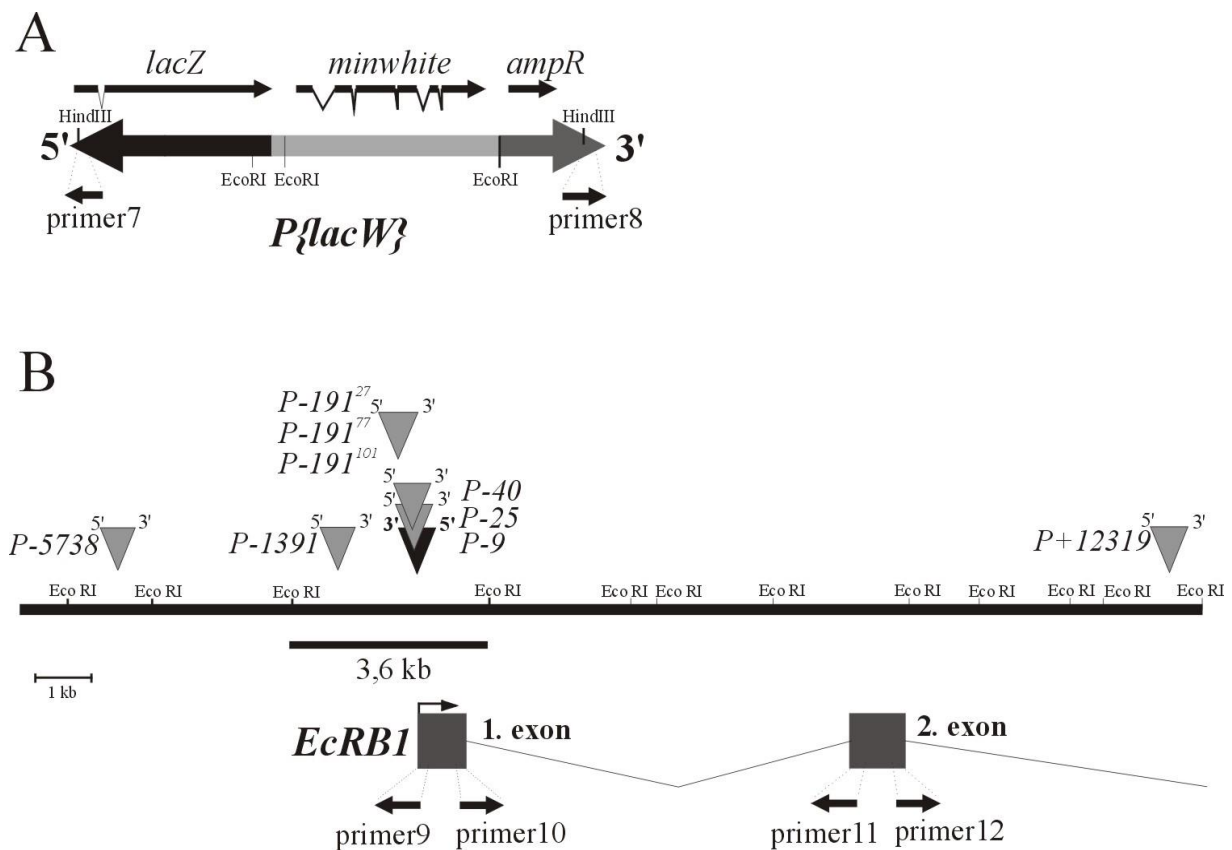
A P-inszerciós mutánsokból plazmid menekítéssel izoláltuk az inszercióval szomszédos genomi DNS szakaszokat, majd ezeket southern hibridizációval vizsgáltuk. Hibridizációs próbának az ábrán látható, az *EcR* gén területét lefedő λ fág klónokat (Talbot Cell73 1993) használtuk. A mutáns törzsekben az *EcR* gén területére eső P-inszerciókat ily módon az ábrán bemutatott régiókba térképeztük.

Finomabb felbontású térképezést a mutánsokból izolált genomi DNS templáton végrehajtott PCR reakciókkal végeztünk. A vizsgálatokhoz a *P{lacW}* elem 5' vagy 3' végére tervezett, kifelé mutató primereket használtuk párban az *EcRB* izoformák első két exonjának végeire specifikus, kifelé mutató primerekkel (**6. ábra**). A primerek pontos helyének ismeretében a képződött PCR termék mérete alapján meghatározhattuk a P-inszerciók helyzetét az *EcRB* izoformák vizsgált exonjaihoz képest. Abból, hogy a P-elem 5' vagy 3' végére specifikus primer alkalmazásával volt-e sikeres a PCR reakció, arra is választ kaptunk, hogy a P-elem milyen orientációban helyezkedik el az *EcR* génhez képest. Az *l(2)k006126* kivételével, minden mutánsban azonosnak mutatkozott az *EcR* gén és a P-inszerció 5'-3' iránya (**6. ábra**).

A plazmid menekítéssel nyert, P-elemmel szomszédos DNS szakaszok nukleotid sorrendjének meghatározásával bázispár pontossággal lokalizáltuk a P-inszerciókat. A menekített DNS szakaszok hét törzs esetében egymással jelentős mértékben átfedve, egy, az első *EcRB* exont magában foglaló kb. 3,6 kb hosszúságú, EcoRI fragmentet fedtek le,

melynek nukleotid sorrendje így módon ismerté vált. Ez lehetővé tette, hogy az említett hét mutáns törzsben megállapítsuk a P-inszerciók pontos helyzetét az ismert *EcRB* transzkripció start pontjához viszonyítva. Később, a *Drosophila* Genom Project előrehaladtával a két távoli inszerciót hordozó törzsben (*l(2)k006210*, *l(2)k009628*) is lehetővé vált a P-elemek pontos lokalizációja (6. ábra). A P-elemek nyolc allél esetében az *EcRB* izoformák transzkripció start pontjától 5' irányban az *EcRB* izoformák szabályozó régiójában helyezkednek el, míg az *l(2)k009628* allél esetében az *EcRB1* izoforma második intronjába ékelődött a P-elem.

A könnyebb tájékozódás érdekében a törzsek jelölésére a következőkben a P-inszerciók *EcRB* transzkripció start ponttól mért távolsága szerinti új azonosítót használunk (6. ábra, 1. Táblázat).



6. ábra. A letális P-inszerciók helyzetének pontos meghatározása.

Az A rész a *P{lacW}* elem szerkezetét mutatja, a benne található három gén feltüntetésével. Az inszerciók helyzetének PCR technikával történő meghatározásához használt P-elem végekre specifikus primereket (primer7, primer8) kis méretű nyilak jelölik.

A B rész a P-inszerciók (háromszögekkel jelölve) helyzetét mutatja az *EcR* régióban. Az inszerciók azonosítóiban szereplő számok az inszerciónak az *EcRB* izoformák transzkripció start pontjától mért távolságát jelzik. A P-elemek beépülési helyének meghatározásához használt *EcRB* exonokra specifikus PCR primereket (primer9, primer10, primer11, primer12) itt is nyilakkal jelöltük. Az ábrán feltüntetettük a plazmid menekítéssel nyert átfedő genomi DNS szakaszok nukleotid sorrendjének meghatározásával feltárt 3,6 kb hosszúságú régiót.

<i>hivatalos azonosító</i>	<i>a P-inszerció helyzete alapján adott azonosító</i>
<i>l(2)k006126</i>	<i>P-9</i>
<i>l(2)k015003</i>	<i>P-25</i>
<i>l(2)k004504</i>	<i>P-40</i>
<i>l(2)k002705</i>	<i>P-191²⁷</i>
<i>l(2)k007722</i>	<i>P-191⁷⁷</i>
<i>l(2)k010122</i>	<i>P-191¹⁰¹</i>
<i>l(2)k008609</i>	<i>P-1391</i>
<i>l(2)k006210</i>	<i>P-5738</i>
<i>l(2)k009628</i>	<i>P+12319</i>

1. Táblázat. A letális P-inszerció *EcR* allélek.

A letális P-inszerció *EcR* alléleket új azonosítóval láttuk el. Az azonosítóban szereplő szám az illető allélben található P-inszerciónak az *EcRB* izoformák transzkripció start pontjához viszonyított helyzetét jelenti bázispárban kifejezve.

4.2.3. A letális P-inszerció *EcR* allélek letális fázisa és fenotípusa

A P-inszerciókat hordozó kromoszómákon esetleg jelenlévő háttérmutációk hatásának kiküszöbölésére a mutánsok letális fázisát az *EcR^{M554fs}* null alléllal (Bender és mtsai, 1997) szemben, heterozigóta állapotban (*EcR^P/EcR^{M554fs}*) határoztuk meg.

A *P+12319* kivételével egyik allél sem mutatott letalitást sem embrió állapotban, sem az első két lárva stádium időszakában. A mutáns állatok normálisan fejlődnek egészen a harmadik (utolsó) lárva stádium végéig, azonban ebben az állapotban fejlődésük megreked. Bebábozódni csak a *P-5738* mutánsok képesek (**2. táblázat**).

A *P+12319* allél embrió letális. A mutáns egyedek eléri az embrionális fejlődés végét, és kb. 30 %-uk kikel a petéből, azonban közvetlenül ezután elpusztul (**3. táblázat**).

vizsgált genotípus	L3 stádiumot elérő egyedek (%)	báb állapotot elérő egyedek (%)
$+(OreR) / EcR^{M554fs}$	92 +/- 13 (306db)	0
$P-9 / EcR^{M554fs}$	102 +/- 13 (73db)	0
$P-25 / EcR^{M554fs}$	95 +/- 12 (98db)	0
$P-40 / EcR^{M554fs}$	99 +/- 10 (73db)	0
$P-191^{27} / EcR^{M554fs}$	95 +/- 12 (93db)	0
$P-1319 / EcR^{M554fs}$	94 +/- 13 (101db)	0
$P-5738 / EcR^{M554fs}$	94 +/- 10 (99db)	92 +/- 9 (83db)
$P+12319 / EcR^{M554fs}$	0	0

2. táblázat. A nem bábozódo és a bábletális P-inszerciós *EcR* allélek letális fázisa.

Az $EcR^{M554fs}/BcGla$ x $EcR^P/BcGla$, illetve az $EcR^{M554fs}/BcGla$ x $+(OreR)/+(OreR)$ (vad típusú kontroll) keresztezésekből származó Bc^+ (EcR^P/EcR^{M554fs} , illetve $+(OreR)/EcR^{M554fs}$) és Bc (EcR^P vagy $EcR^{M554fs}/BcGla$, illetve $+(OreR)/BcGla$) egyedek számát határoztuk meg a harmadik lárva stádium (L3) végén illetve báb állapotban. Minden esetben három párhuzamos kísérletet végeztünk. Az EcR^P allélek esetében a Bc^+ utódok számát a Bc utódok 1/2-részéhez, az $OreR$ vad típusú kontroll esetében a Bc^+ utódok számát az összes Bc utód számához viszonyítottuk. A táblázat a három-három párhuzamos kísérlet eredményének átlag és szórás értékeit tartalmazza százalékban kifejezve. Zárójelben a három párhuzamos keresztezésből származó Bc^+ utódok számának összege szerepel.

vizsgált genotípus	az egyedfejlődés egyes stádiumaiban elpusztult egyedek (%)	
	embrió	L1
$P+12319 / EcR^{M554fs}$	69 +/- 1 (107 db)	29 +/- 1 (46 db)

3. táblázat. A *P+12319* embrióletális allél letális fázisa

A $P+12319 / +(OreR)$ x $EcR^{M554fs} / +(OreR)$ keresztezésből két párhuzamos kísérletben 300 illetve 320 petét gyűjtöttünk, majd megszámoltuk a ki nem kelt petéket valamint az elpusztuló lárvákat. Az egyes fejlődési állapotokban elpusztult állatok számát az összes pete 1/4 részéhez viszonyítva, %-ban kifejezve adtuk meg. A táblázat a két párhuzamos kísérlet alapján számított átlag és szórás értékeket tartalmazza. Zárójelben a két kísérletben összesen elpusztult egyedek száma szerepel. Az L1 stádiumban elpusztuló egyedek mindegyike közvetlenül a petéből való kikelés után pusztult el.

A vad típusban a bábozódoást követő kb. 1 órás időszakot fehér előbáb (pupárium) állapotnak hívjuk (P1). Ebben a fejlődési szakaszban nyeri el a kutikula a jellegzetes barnás színét. Ezután a barna előbáb állapot (P2) következik. A bábozódoás után kb. 3 órával egy gáz buborék jelenik meg az állatok testében (P3), ami kb. 12 órával a bábozódoás után kiürül az állat posterior végén a kutikula és a fejlődő előbáb epidermisze közötti térbe. Közvetlenül ezután következik be a fej kitürődése, és a lábak meghosszabbodása (P5). Ez a viszonylag gyors esemény felel meg az előbáb-báb átalakulásnak. Ezután, a báb állapotban már

egyértelműen felismerhetők a kifejlett legyekre jellemző testtájuk, a fej a lábak és a szárnyak eléri végső méretüket.

A *P-9*, *P-25*, *P-40*, *P-191*²⁷, *P-1319* allélek mutáns egyedei nem bábozódó lárvaként több napig életben maradnak, időközben mozgásuk lelassul, majd elülső spirákulumaikat kitűrve megmerevednek, és végül elpusztulnak. Az elpusztuló lárvák kutikulája, a vad típusú bábozódó állapotnak megfelelően elkezd megkeményedni, majd elválk a lárvális epidermiszről, azonban a vad típussal ellentétben nem barnul meg. A mutáns lárvák teste nem veszi fel a jellegzetes, hordóra emlékeztető báb alakot, a mutáns egyedek lárvákra jellemző megnyúlt formában pusztulnak el (**7. ábra**).

A *P-5738* mutánsok a vad típushoz nagyon hasonló képet mutatva bebábozódnak, azonban a kutikulájuk, a többi mutánshoz hasonlóan, szintén nem barnul be (**7. ábra**). Ezekben az állatokban a fent említett buborék képződés nem figyelhető meg. Ettől függetlenül kb. 30 %-ban eléri a P5 stádiumot, illetve egy kis részük eljut a báb állapot utolsó szakaszáig, az ún. farát adult állapotba (**4. táblázat**). A fej kitürődése és a lábak meghosszabbodása nem megy végbe tökéletesen ezekben az egyedekben, így a normálisnál általában kisebb fej, és rövid deformált lábak jellemzőek rájuk. A *P-5738* allélt hordozó kromoszóma nem tartalmaz egyéb, az életképességet befolyásoló háttér mutációt, így lehetőségünk volt megvizsgálni a *P-5738 / P-5738* homozigóta mutánsok fenotípusát is (**4. táblázat**). A *P-5738* allél hipomorf jellegét mutatja, hogy homozigóta formában gyengébb fenotípust eredményez, mint a null alléllal alkotott heterozigóta (*P-5738 / EcR^{M554fs}*) állapot. A *P-5738 / P-5738* homozigóta egyedek nagyobb arányban jutnak el a késő báb állapotba (45%), illetve 12%-uk eléri a kifejlett kort, kikel a bábból.

vizsgált genotípus	a báb állapot különböző stádiumaiban elpusztuló egyedek (%)			kifejlett állapotot elérő egyedek (%)
	előbáb (P1-P4)	korai báb (P5-P11)	Késői báb (P12-P15)	
<i>P-5738 / EcR^{M554fs}</i>	61 +/- 13 (121 db)	29 +/- 10 (57 db)	9 +/- 5 (19 db)	0 (0 db)
P-5738 / P-5738	32 +/- 1 (29 db)	11 +/- 4 (11 db)	45 +/- 5 (40 db)	12 +/- 3 (11 db)

4. táblázat. A *P-5738* bábletális allél részletes letális fázisa

Ismert számú *P-5738 / EcR^{M554fs}* illetve *P-5738 / P-5738* genotípusú L3 lárvát szokásos módon tenyésztettünk, és meghatároztuk az elpusztuló lárvák fejlődési állapotát. A báb állapoton belül három stádiumot különítettünk el: előbáb (P1-P4), korai báb (P5-P11), és késői báb (P12-P15) állapotokat (Hivatkozás). Az egyes fejlődési állapotokban elpusztult egyedek számát az összes egyed számához viszonyítva, %-ban kifejezve adtuk meg. A táblázat három-három párhuzamos kísérlet eredményéből számított átlag és szórás értékeket tartalmazza. Zárójelben a három párhuzamos kísérletben az adott fejlődési állapotban elpusztult egyedek számának összege szerepel.

A *P-1319* mutáns fenotípusa alapján átmenetet képvisel a *P-5738* és a többi allél között. A fejlődésben megrekedt mutáns lárvák teste bizonyos mértékben megrövidül, ez azonban nem éri el a vad típusú bábokra jellemző mértéket. A kutikula ezekben az állatokban is világos színű marad (7. ábra). P5 stádiumot elérő egyedeket nem lehet megfigyelni közöttük.



7. ábra. A letális P-inszerciós *EcR* allélek letális fenotípusa

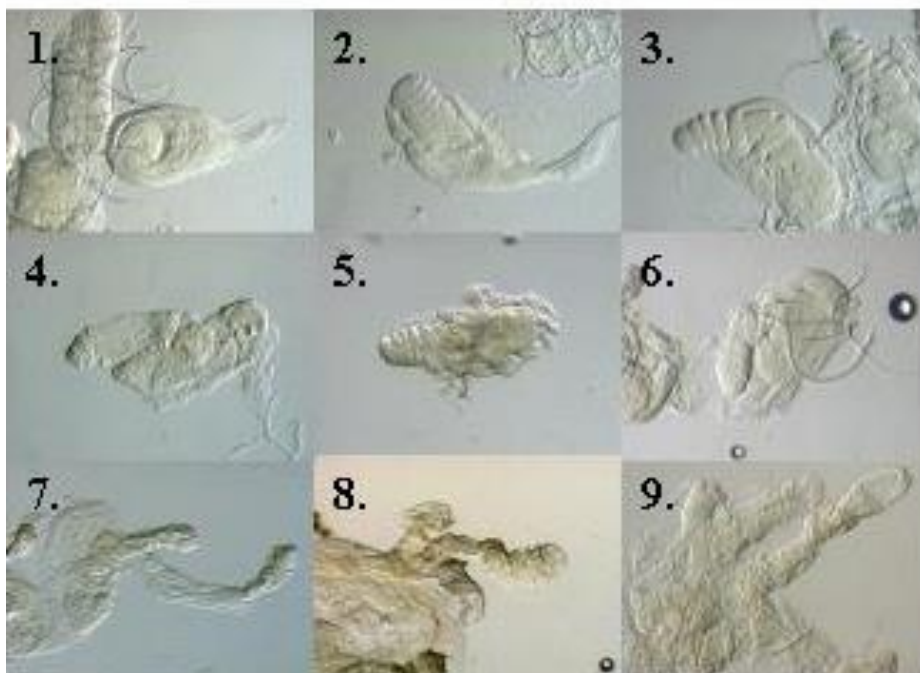
Az ábrán a letális P-inszerciós *EcR* mutánsok fejlődésükben megrekedt elpusztult lárvái láthatók. **1.** $+(OreR / +(OreR)$ vad típusú fehér báb (P1). **2.** $+(OreR / +(OreR)$ előbáb (P3). **3.** $P-9/EcR^{554fs}$, **4.** $P-25/EcR^{554fs}$, **5.** $P-40/EcR^{554fs}$, **6.** $P-191^{27}/EcR^{554fs}$, **7.** $P-1319/EcR^{554fs}$, **8.** $P-5738/EcR^{554fs}$.

A metamorfózis kezdetén jellegzetes, ekdizon szabályozás alatt álló változások indulnak el a vad típusú szövetekben. A bábozódás időszakában az addig folyamatosan osztódó sejtekből álló imágó korongok elkezdnek kitűrődni (Fristrom és mtsai, 1993). Ez a változás a láb imágó korongokon a legszembetűnőbb. A lárvális szövetek a metamorfózis során hisztolízis eredményeképpen elpusztulnak. Ennek első jele a vakbelek rövidülése, ami

már a bábozódás kezdetén észlelhető, majd kb. 4 órával a bábozódás után fejeződik be a vakbelek teljes eltűnésével (Jiang és mtsai, 1997). A középbélben emellett másik szembetűnő változás is lezajlik. A bábozódás után 2 órával elkezdődik az addig nyugalomban lévő, néhány sejtől álló szigeteket alkotó, diploid imaginális sejtek osztódása. Ezek a sejtek rövid időn belül egy diploid sejtekből álló összefüggő csövet képeznek a politén lárvális sejtek körül, kialakítva az adult középbélet (Robertson, 1936). Ebben az időszakban a lárvális sejtek pusztulása következtében a középbél jelentősen megrövidül.

Megvizsgáltuk az említett események lejátszódását a metamorfózis kezdetén elpusztuló P-inszerciós mutáns állatokban. (A *P-5738* allél esetében az előbáb állapotban megrekedő egyedeket vizsgáltuk).

Az imágókorongok kitűródése minden mutánsban elkezdődik. Az *EcRB* transzkripció start pont közvetlen közelében elhelyezkedő inszerciók (*P-9*, *P-25*, *P-40*) esetében a folyamat korán (a vad típusban 2-4 órával a bábozódás utáni állapotnak megfelelően) elakad, míg a távolabbi inszerciókat hordozó mutánsokban (*P-191²⁷*, *P-1319*, *P-5738*) jóval nagyobb mértékű láb imágókorong megnyúlás tapasztalható (**8. ábra**).

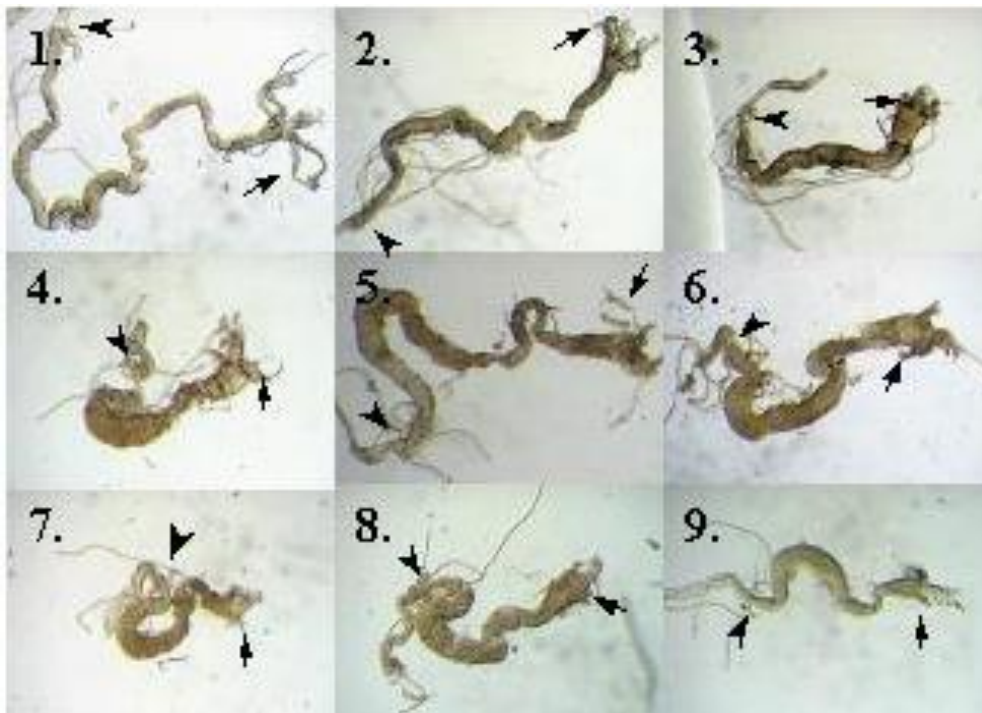


8. ábra. A láb imágókorongok kitűródése a letális P-inszerciós *EcR* mutánsokban.

Az ábrán a fejlődésükben megrekedt, elpusztult letális P-inszerciós *EcR* mutáns lárvák láb imágó korongjai láthatók. **1.** $+(OreR) / +(OreR)$ vad típus fehér báb (P1), **2.** $+(OreR) / +(OreR)$ vad típus a bábozódás után két órával, **3.** $+(OreR) / +(OreR)$ vad típus a bábozódás után négy órával, **4.** $P-9/EcR^{554fs}$, **5.** $P-25/EcR^{554fs}$, **6.** $P-40/EcR^{554fs}$, **7.** $P-191^{27}/EcR^{554fs}$, **8.** $P-1319/EcR^{554fs}$, **9.** $P-5738/EcR^{554fs}$.

A vakbelek rövidülése is megfigyelhető minden vizsgált mutánsban. A transzkripció start közvetlen közelében elhelyezkedő inszerciók ebben az esetben is erősebb fenotípust eredményeznek, vagyis ez a folyamat is hamarabb áll le ezekben a mutánsokban (**9. ábra**).

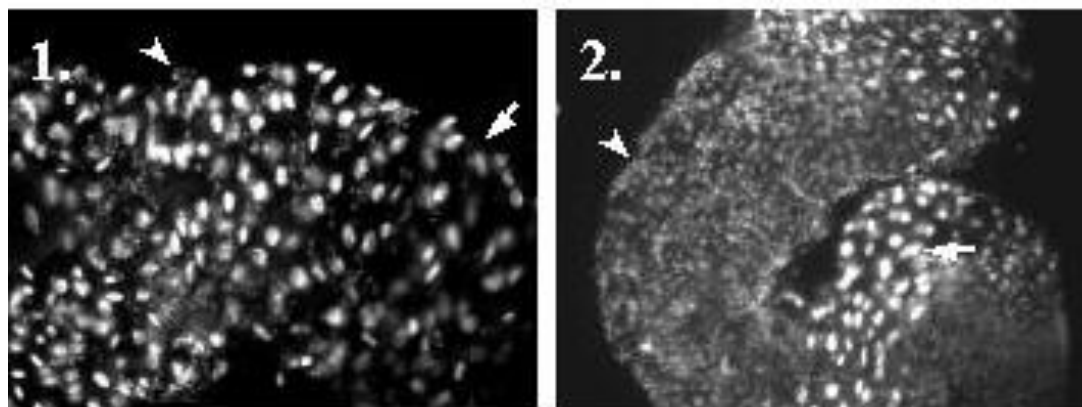
A teljes középbél megrövidülése is jellemző az összes allélra. A *P-25* mutatja a legerősebb fenotípust (legkisebb mértékű rövidülés). Érdekes módon ezen fenotípus alapján a *P-9* a másik két közeli inszerciót hordozó mutánsához (*P-25*, *P-40*) képest gyengébb allélnak tekinthető (**9. ábra**).



9. ábra. A vakbelek és a teljes középbél rövidülése a letális P-inszerciós mutánsokban.

Az ábrán a fejlődésükben megrekedt, elpusztult letális P-inszerciós *EcR* mutáns lárvák bélcsatornája látható. Nyilak a vakbeleket, nyílhegyek a középbél-utóbél határát jelzik. **1.** $+(OreR) / +(OreR)$ vad típus fehér báb (P1), **2.** $+(OreR) / +(OreR)$ vad típus a bábozódás után két órával, **3.** $+(OreR) / +(OreR)$ vad típus a bábozódás után négy órával, **4.** *P-9/EcR^{554fs}*, **5.** *P-25/EcR^{554fs}*, **6.** *P-40/EcR^{554fs}*, **7.** *P-191²⁷/EcR^{554fs}*, **8.** *P-1319/EcR^{554fs}*, **9.** *P-5738/EcR^{554fs}*.

A középbéli imaginális sejtek osztódása, és belőlük a lárvális sejteket körülvevő zárt cső kialakulása szintén minden allél esetében megfigyelhető. A **10. ábrán** a középbélben végbemenő változások alapján legerősebb fenotípust mutató *P-25* mutáns középbelének DAPI festett képét mutatom be. A középbél elülső részén jól láthatóak a nagyméretű politén sejtmagokkal rendelkező lárvális bélsejtek, a közöttük a jelentős mértékben felszaporodott kisméretű diploid imaginális sejtekkel (**10. ábra 1. kép**). A középbél hátsó, utóbél melletti szakaszán az imaginális sejtek már zárt csövet alkotnak a politén lárvális sejtek körül (**10. ábra 2. kép**).



10. ábra. A középbéli imaginális sejtek a P-25 mutánsban.

Az ábrán *P-25/EcR^{554fs}* mutáns, fejlődésben megrekedt lárva közepbele látható DAPI festéssel. A nagyméretű politén lárvális sejtek sejtmagját nyíllal, az imaginális kisméretű diploid sejtmagokat nyílhegygel jelöltük. **1.** A középbél elülső részében az imaginális sejtek osztódása elkezdődött. **2.** A középbél hátsó részén az imaginális sejtek zárt csövet képeznek a lárvális belsejtek körül.

A letális P-inszerciós *EcR* allélek fenotípusuk alapján tehát két csoportba sorolhatók. Az egyik csoportba a *P+12319* embrió letális allél tartozik. Az ismert *EcR* allélek közül az izoformák közös régióját érintő gyengébb allélek (pl. *EcR^{R320H}* vagy az *EcR^{S531T}*) rendelkeznek a *P+12319* allélhez hasonló fenotípussal. Az amorf allélek (*EcR^{E261st}*, *EcR^{M554fs}*, *EcR^{V559fs}*, *EcR^{In(2LR)10-2}*), melyek teljes mértékben inaktiválják az összes *EcR* izoformát, erősebb fenotípust mutatnak (csupán 0-2%-ban kelnek ki a petéből) (Bender és mtsai, 1997).

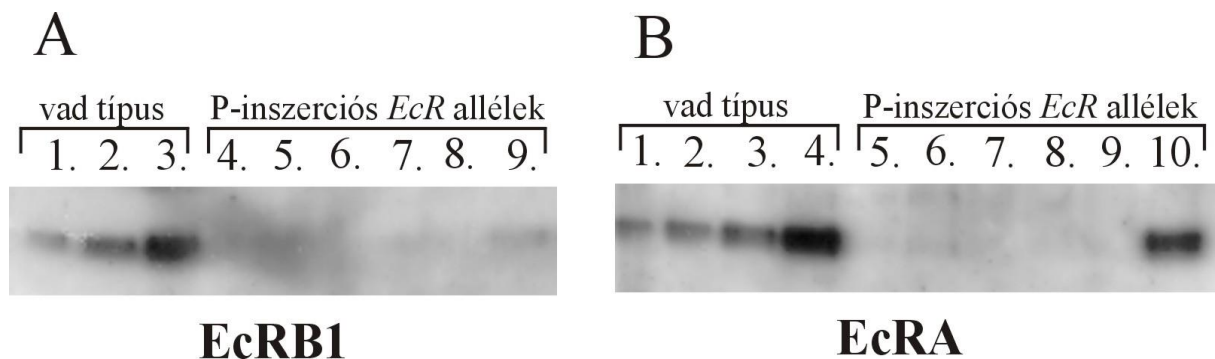
A nem bábozódó fenotípust mutató *P-9*, *P-25*, *P-40*, *P-191²⁷*, *P-1319* és a báb letális *P-5738* allélek alkotják a másik csoportot. Ezek az allélek az *EcRB* izoformák 5' szabályozó régiójában hordozzák a P-elem beépülést. Fenotípusuk aszerint változik, hogy az illető mutánsban a P-elem az *EcRB* izoformák transzkripciós kezdőpontjától milyen távolságra található. A két *EcRB* izoforma (*EcRB1* és *EcRB2*) átírása azonos kezdőpontról indul, ennek megfelelően a transzkripciójuk minden bizonnyal azonos szabályozás alatt áll. A P-inszerciós allélek tehát nagy valószínűséggel egyszerre mind a két *EcRB* izoforma kifejeződését gátolják. A transzkripciós startpont közelében elhelyezkedő P-elemek génműködés gátló hatása valószínűleg nagyobb, emiatt eredményezhetnek a távolabbi inszerciókhöz képest erősebb fenotípust. Minden P-inszerciós allél hipomorfnak tekinthető az *EcRB* izoformákra nézve, hiszen a két *EcRB* izoformát teljes mértékben inaktiváló allélek (Schubiger és mtsai, 1998) erősebb fenotípussal rendelkeznek (a mutáns állatok többsége első vagy második stádiumos lárvaként pusztul el), mint a legerősebb *P-25* vagy *P-40* allélek.

4.2.4. Az *EcR* izoformák kifejeződése a letális P-inszerciós mutánsokban

Western blot kísérletekben megvizsgáltuk az *EcRA* és az *EcRB1* izoformák kifejeződését a P-inszerciós *EcR* allélek vándorló harmadik stádiumos lárváiban. Ebben a fejlődési állapotban minden *EcR* izoforma magas szinten fejeződik ki a vad típusú állatokban.

Az *EcRB1* fehérje elleni ellenanyaggal nem, vagy nagyon alacsony szinten tudunk fehérjét kimutatni a mutáns lárvákban (**11. ábra**). Ez az eredmény megfelelt azon várakozásunknak, miszerint az *EcRB* izoformák közös szabályozó régiójába ékelődött P-elemek gátolják az *EcRB* izoformák kifejeződését. A *P-5738* törzsben találtunk legtöbb *EcRB1* fehérjét, ami összhangban van a fenotípus vizsgálat eredményével, mely szerint a *P-5738* mutáns tekinthető a leggyengébb allélnek. Ebben a törzsben az inszerció nagy távolságra (mintegy 6 kb) helyezkedik el az *EcRB* izoformák transzkripciós kezdőpontja előtt, ami láthatóan kisebb mértékű génkifejeződés gátlást eredményez.

Az *EcRA* fehérje mennyiségének vizsgálata meglepő eredményt hozott. A P-inszerciót fordított orientációban hordozó *P-9* allél kivételével, melyre normális *EcRA* szint volt jellemző, egyik vizsgált mutánsban sem volt detektálható mennyiségben *EcRA* fehérje (**11. ábra**).



11. ábra. Az *EcRA* és az *EcRB1* fehérjék jelenléte a letális P-inszerciós *EcR* allélekben.

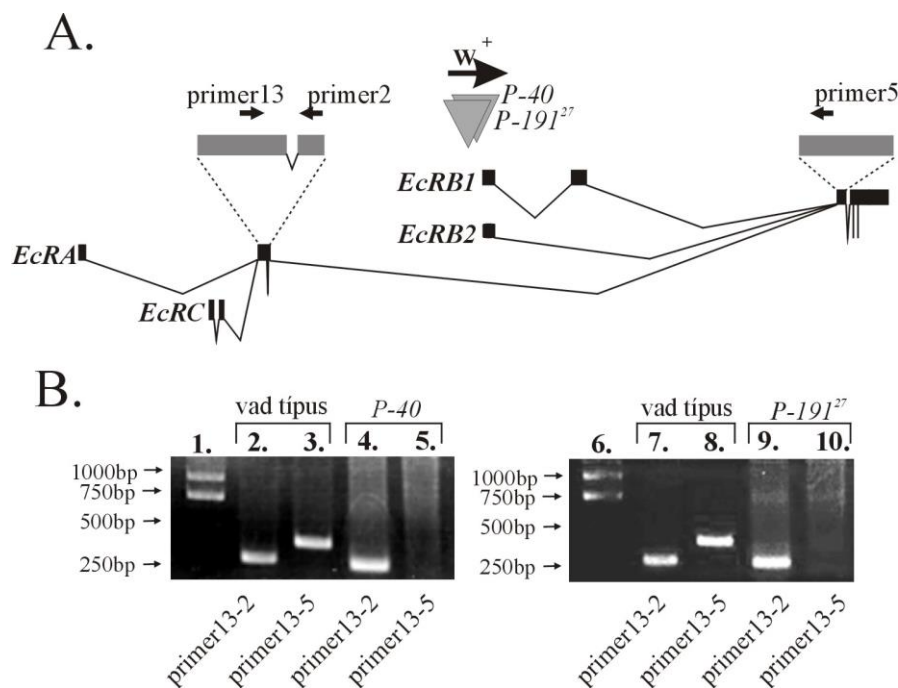
Az **A** részben az *EcRB1* elleni ellenanyaggal vándorló harmadik stádiumos lárvákon végzett western blot eredménye látható. Az **1.**, **2.**, **3.**, minta *Df(2R)nap2/(OreR)* genotípusú egyedekből, a **4.**, **5.**, **6.**, **7.**, **8.**, **9.**, minták rendre *P-9/Df(2R)nap2*, *P-25/Df(2R)nap2*, *P-40/Df(2R)nap2*, *P-191²⁷/Df(2R)nap2*, *P-1391/Df(2R)nap2* és *P-5738/Df(2R)nap2* genotípusú egyedekből származtak. A **3.**, **4.**, **5.**, **6.**, **7.**, **8.**, **9.**, minták 1, a **2.** minta 0,5, a **3.** minta 0,25 lárvának megfelelő fehérje mennyiséget tartalmaz.

A **B** rész *EcRA* specifikus ellenanyaggal végzett western blot eredményét mutatja. A fehérje mintákat ebben a kísérletben is harmadik stádiumos vándorló lárvákból készítettük. Az **1.**, **2.**, **3.**, **4.**, minta *Df(2R)nap2/(OreR)* genotípusú egyedekből, az **5.**, **6.**, **7.**, **8.**, **9.**, **10.** minták rendre *P-5738/Df(2R)nap2*, *P-1391/Df(2R)nap2*, *P-191²⁷/Df(2R)nap2*, *P-40/Df(2R)nap2*, *P-25/Df(2R)nap2*, *P-9/Df(2R)nap2* genotípusú egyedekből származtak. A **3.**, **4.**, **5.**, **6.**, **7.**, **8.**, **9.**, minták 1, a **2.** minta 0,5, a **3.** minta 0,25, a **4.** minta 0,125 lárvának megfelelő fehérje mennyiséget tartalmaz.

A P-inszerciós *EcR* allélekben az *EcRA* fehérjét kódoló az *EcRA* és az *EcRC* izoformákat tekintve a P-elemek intronban helyezkednek el. Az *EcRA* fehérje elleni ellenanyaggal végzett western blot eredménye alapján tehát azt a következtetést vonhatjuk le, hogy az intronban elhelyezkedő *P{lacW}* inszerciók képesek megakadályozni az érintett gén kifejeződését, ha a génnel azonos az 5'-3' orientációjuk, míg fordított elhelyezkedés esetében (*P-9*) nem érvényesül ez a gátló hatás.

A *P{lacW}* elem két gént is tartalmaz, melyek 5'-3' iránya megegyezik a P-elemével. Az egyik az enhanszer csapdázást biztosító *lacZ*, a másik a szemszín markerként használt *miniwhite* gén (6. ábra). Ezen gének 3' végi transzkripció stop szignáljai megállíthatják a P-inszerció által érintett azonos orientációjú gén átíródását. Emellett a P-elem beépülésével a P-elem által hordozott gének exonjai bekerülve az inszerció által érintett intronba a normális intron kivágódást is megzavarhatják.

A kérdés tisztázására RT-PCR kísérletekben követtük nyomon az *EcRA* fehérjét kódoló izoformák transzkripciójának alakulását a *P-191²⁷* és a *P-40* mutánsokban (12. ábra).



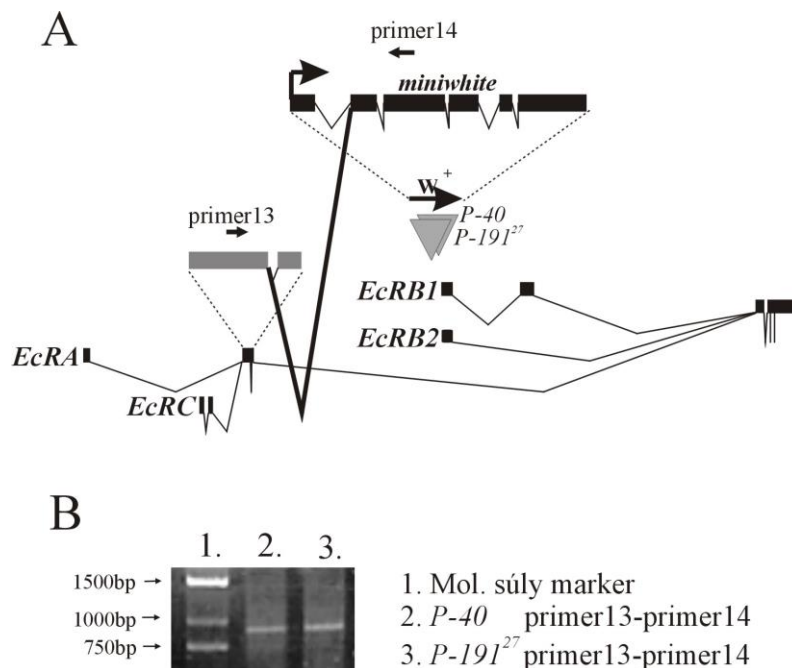
12. ábra. Az *EcRA* fehérjét kódoló izoformák kifejeződésének vizsgálata a *P-40* és *P-191²⁷* mutánsokban RT-PCR technikával.

Az A részben az *EcR* gén exon intron szerkezete látható. A két vizsgált P-inszerció helyzetét háromszögek, az RT-PCR kísérletekben használt primerek elhelyezkedését nyilak jelzik.

A B részben $+(OreR) / +(OreR)$ (2., 3., 7., 8. minta), a *P-40/Df(2R)nap2* (4., 5. minta) és a *P-191²⁷/Df(2R)nap2* (9., 10. minta) genotípusú vándorló harmadik stádiumos lárvákon végzett RT-PCR kísérletek eredménye látható. Az 1. és 6. minta mol.súly marker, a 2., 4., 7., 9., minták a 13-2 primer párral, a 3., 5., 8., 10. minták a 13-5 primer párral végzett kísérletek eredménye.

A második és a harmadik *EcRA* exonra specifikus két primerrel (primer13, primer2) mindkét vizsgált törzsben ki tudtunk mutatni érett mRNS-t, tehát az első exonokat tartalmazó régióban transzkripció és az intron kivágódás normálisan folyik. A P-inszerció két oldalán lévő exonokba tervezett primerekkel (primer13, primer5) azonban nem kaptunk PCR terméket, vagyis nem képződik olyan transzkriptum, melyben az inszerciót tartalmazó intron normálisan kivágódna, és végbemenne az inszerciótól 5' és 3' irányban elhelyezkedő exonok fúziója.

Az *EcRA* izoforma második exonjára, és a *miniwhite* gén harmadik exonjára tervezett primer párral (primer7, primer10) végezve az RT-PCR-t, sikerült kimutatni egy *EcRA* és *miniwhite* exonokat tartalmazó fúziós mRNS-t. A PCR fragmentum nukleotid sorrendjét meghatározva kiderült, hogy a kialakuló kiméra mRNS-ben az *EcRA* izoforma harmadik exonja kapcsolódott össze a *miniwhite* gén második exonjával, miközben a közöttük lévő szakasz intronként kivágódott (**13. ábra**). Az *EcRA-miniwhite* kiméra mRNS-ben a két idegen exon kapcsolódása frameshift mutációt eredményez a *miniwhite* gén második exonjában, melynek következtében 39 aminosav után egy stop kodon keletkezik.



13. ábra. *EcRA-miniwhite* kiméra mRNS kimutatása a P-40 és P-191²⁷ mutánsokban

Az **A** részben az EcR gén izoformáinak exon intron szerkezete látható. A két vizsgált P- inszerciót háromszögek jelzik. Az *EcRA-miniwhite* kiméra mRNS kimutatásához használt PCR primerek helyzetét kis méretű nyilak mutatják.

A **B** részben az a P-40/*Df(2R)nap2* (2. minta) és a P-191²⁷/*Df(2R)nap2* (3. minta) genotípusú vándoló harmadik stádiumos lárvákban a 13-14 primer párral végzett RT-PCR kísérletben kapott (az *EcRA-miniwhite* kiméra mRNS-nek megfelelő) termékek láthatók.

Az RT-PCR igen érzékeny módszer, minimális mennyiségű templát molekula kimutatására is alkalmas. Mivel a két vizsgált P-inszerciós allél (*P-191*²⁷ és *P-40*) esetében RT-PCR technikával sem tudtunk *EcRA* fehérjét kódoló mRNS-t kimutatni, az *EcRA* és az *EcRC* izoformákra nézve ezek az allélek gyakorlatilag null allélnak tekinthetők. Az RT-PCR kísérleteink segítségével feltárt mechanizmus valószínűleg általánosan jellemző az intronban elhelyezkedő P-elemekre, így minden bizonnyal érvényes a többi P-inszerciós *EcR* allélre is. Ez alapján a *P-25*, *P-1319* és *P-5738* alléleket az *EcRA* és *EcRC* izoformák kifejeződésére nézve ugyancsak amorf vagy ahhoz közeli erős hipomorf alléleknek tekintjük.

A *P+12319* allél embrió letális fenotípusa, ami az összes *EcR* izoformát egyszerre inaktíváló allélekre jellemző, szintén jól magyarázható az intronban elhelyezkedő P-inszerciók géninaktíváló hatásával. Ezen allél esetében ugyanis a P-elem minden *EcR* izoformát tekintetve intronban található, az *EcR* génnel azonos 5'-3'orientációban, ily módon a *P+12319* mutánsokban a P-inszerció jelenléte minden *EcR* izoforma kifejeződését gátolja.

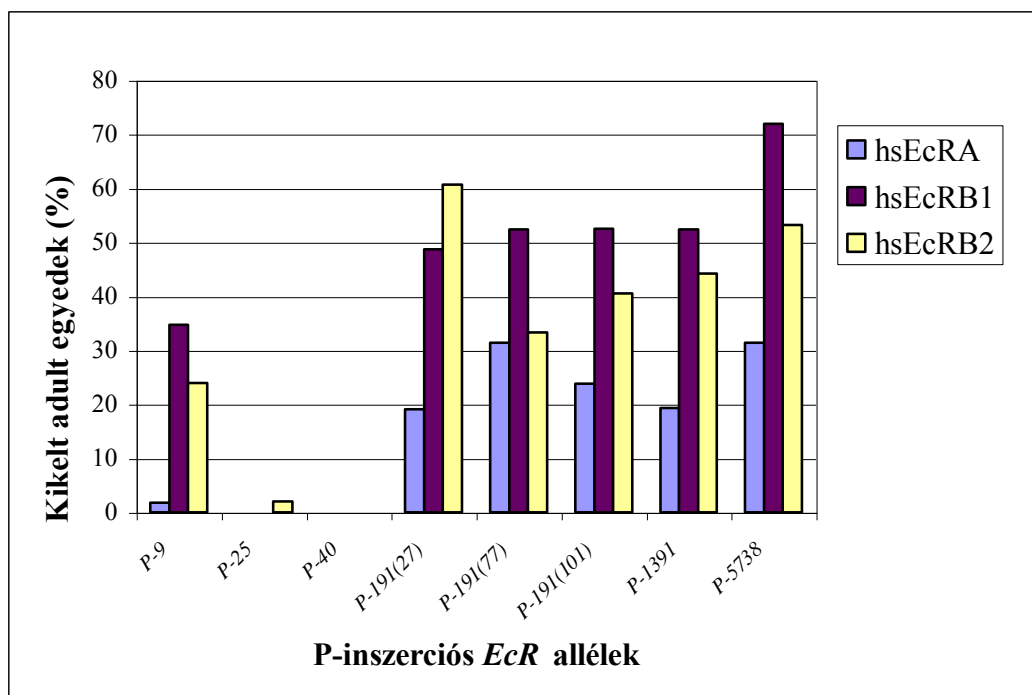
4.2.5. A letális P-inszerciós allél menekítése a különböző *EcR* izoformákkal

Annak eldöntésére, hogy a P-inszerciós *EcR* mutánsokban tapasztalt letális fenotípus mely izoformák hiányának következtében alakul ki, valamint, hogy az egyes izoformák képesek-e egymást helyettesítve működni, menekítési kísérleteket végeztünk. A kísérletekhez Bender és munkatársai által előállított transzgén konstrukciókat használtuk, melyekben az egyes *EcR* izoformák (*EcRA*, *EcRB1*, *EcRB2*) kifejeződését hőindukálható (*hsp70*) promóter biztosította (Bender és mtsai, 1997). A hősokk promóter alkalmazása lehetővé tette, hogy az *EcR* fehérjék termelését csak rövid időszakra korlátozzuk. Egyetlen hősokk alkalmazásával (30 perc, 37 °C) ugyanis a néhány órán belül minden szövetben nagy mennyiségben termelődő transzgén eredetű *EcR* fehérje 8-10 óra múlva eltűnik a sejtekből (Li és mtsai, 2000). Ily módon meghatározhattuk az egyedfejlődés azon időszakát, amikor a mutánsok normális fejlődéséhez szükség van a transzgénről származó *EcR* fehérjére, vagyis megállapíthattuk, hogy a mutációk következtében fellépő ecdizon receptor hiány milyen fejlődési állapotokban vezet az egyedfejlődés megrekedéséhez és a mutáns állatok pusztulásához.

Első kísérletsorozatunkban az inszerciós mutánsok *EcR* null alléllal szembeni heterozigóta (*EcR^P/EcR^{M554fs}*), vándorló harmadik stádiumos lárváit, melyek egy kópiában hordozták az egyik *EcR* izoformát kifejező transzgént, egy alkalommal hősokkoltuk (37°C-on, 30 percig), és azt vizsgáltuk, milyen arányban alakulnak ki belőlük kifejllett egyedek.

Azon mutánsok letális fenotípusát, melyek az *EcRB* izoformák transzkripció startpontjától távolabb hordozzák a P-inszerciót (*P-191²⁷*, *P-191⁷⁷*, *P-191¹⁰¹*, *P-1391*, *P-5738*), mind a három *EcR* izoforma kifejeztetése menekítette. A menekítés hatására a mutáns egyedek jelentős része elérte a kifejlett állapotot. Az egyes izoformák menekítő képessége eltérőnek mutatkozott. Az *EcRB1* bizonyult a leghatékonyabbnak, az *EcRB2* ennél valamivel gyengébben működött, míg az *EcRA* csak kb. fele olyan mértékben menekített, mint az *EcRB* izoformák (14. ábra)

A menekítések hatására a leggyengébb allél (*P-5738*) mutáns egyedei érték el legnagyobb számban a felnőtt kort, míg a P-inszerciót az *EcRB* transzkripció startpont közvetlen közelében tartalmazó legerősebb allélek (*P-40*, *P-25*) egyik *EcR* izoforma hatására sem produkáltak kifejlett egyedeket. A *P-9* mutáns, melyben csak az *EcRB* izoformák kifejeződése gátolt, ebben a kísérletben is kivételesen viselkedett. Az *EcR* izoformák egyetlen hősekkel történő kifejeztetése elegendő volt ahhoz, hogy a *P-9* mutánsok, a távoli inszerciós allélekhez képest kisebb arányban, de eljussanak a kifejlett állapotba (14. ábra).

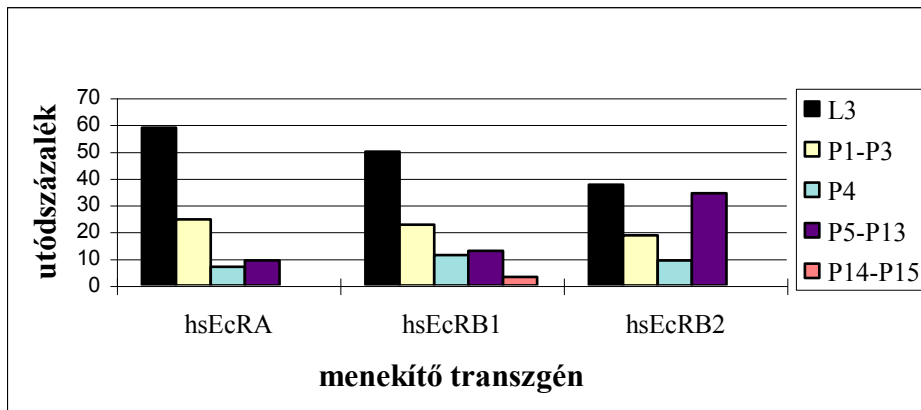
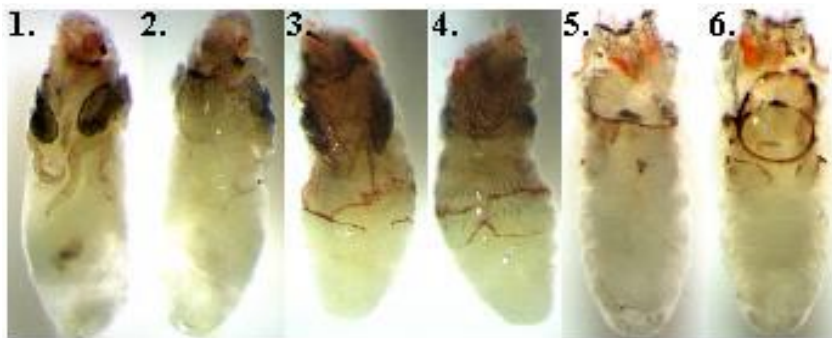


14. ábra. A letális P-inszerciós *EcR* allélek menekítése a különböző *EcR* izoformákkal.

A *hsEcR/hsEcR* ; *EcR^{554fs}/BcGla* x *+/+* ; *EcR^P/BcGla* keresztezésből (ahol a *hsEcR* az egyes *EcR* izoformákat kifejező transzgént az *EcR^P* a letális P-inszerciós *EcR* alléleket jelöli) származó *hsEcR/+* ; *EcR^{554fs}/EcR^P* vándorló harmadik stádiumos lárvákat egy alkalommal hősekoltunk, majd azt vizsgáltuk, milyen arányban jönnek létre belőlük kifejlett egyedek. Kontrollnak hősek nélkül is elvégeztük a kísérletet. Minden kísérletben több mint 100 db egyed vizsgáltunk. A hősek nélküli kontroll kísérletekben egyetlen esetben sem kaptunk kifejlett állatot. Az ábrán feltüntetett oszlopok, az egyes kísérletekben kapott kifejlett egyedek számának a vizsgált egyedek számához viszonyított arányát mutatják %-ban kifejezve.

A *P-25* és a *P-40* allélek esetében, melyek mutáns egyedei egyik *EcR* izoformával végzett menekítés során sem érték el a kifejlett kort, részleges menekítést tapasztaltunk, vagyis a lárvák kb. fele bebábozódott. A *P-40* mutánst részletesen megvizsgáltuk abból a szempontból, hogy az egyszeri hősokk kezelés után az állatok milyen arányban érik el a báb állapot különböző fejlődési szintjeit (**15. ábra A része**). Ezekben a kísérletekben is az *EcRA* izoforma volt legkevésbé hatékony. Mind a három izoformával végzett menekítés során keletkeztek a P5 stádiumon túljutó egyedek, melyek nagy többsége súlyos fejlődési rendellenességeket mutatott. Gyakori volt a „microcephal” fenotípus, ami arra utal, hogy a fejkítürődés nem ment végbe tökéletesen. A lábak meghosszabbodása is gyakran abnormális ezekben az állatokban, valamint az egyes testtájak asszinkron fejlődése is megfigyelhető bennük (bizonyos testrészek fejlődése elakad, míg mások tovább fejlődnek) (**15. ábra B része**).

A *P-40* mutáns menekítését az *EcRB2* izoformával úgy is elvégeztük, hogy az első, lárvális hősokk után bebábozódó állatokat P3 stádiumban újból hősokkoltuk. Ebben az esetben a kezelt egyedek kb. 50%-a eljutott a kifejlett állapotba. Ez az eredmény arra utal, hogy a legerősebb allélek mutáns egyedei azért nem voltak képesek a bábozódás előtt alkalmazott egyetlen hősokk hatására elérni a kifejlett állapotot, mert a hősokk kezelés következtében termelődő *EcR* fehérje mennyisége valószínűleg olyan alacsony szintre csökkent a következő ekdizon szabályozás alatt álló fejlődési lépés időszakára (kb. 12 órával a bábozódás után bekövetkező előbáb-báb átmenet), hogy már nem volt képes maradéktalanul ellátni a feladatát. A gyengébb allélek esetében az endogén *EcR* izoformák működése kevésbé gátolt, így a mutáns állatokban keletkezik bizonyos mennyiségű *EcR* fehérje. Ez az ekdizon receptor szint, úgy tűnik önmagában elegendő a bábozódás utáni fejlődési lépések normális lejátszódásához, még ha a menekítő transzgenről termelődött *EcR* fehérje teljes mértékben degradálódik is a bábozódás után.

A**B****15. ábra. A P-40 allél menekítése a különböző EcR izoformákkal.**

A *hsEcR/hsEcR* ; *EcR^{554fs}/BcGla* x *+/+* ; *EcR^P/BcGla* keresztezésből (ahol a *hsEcR* az egyes *EcR* izoformákat kifejező transzgént az *EcR^P* a letális P-inszerciós *EcR* alléleket jelöli) származó *hsEcR/+* ; *EcR^{554fs}/ EcR^P* vándorló harmadik stádiumos lárvákat egy alkalommal hősokkoltunk, majd azt vizsgáltuk, hogy milyen arányban érik el a báb állapot különböző stádiumait. A báb állapoton belül öt kategóriát (P1-P3 , P4, P5-P13 és P14-P15) különböztettünk meg.

Az A részben a három (*hsEcRA*, *hsEcRB1* és *hsEcRB2*) *EcR* transzgénnel történt menekítés eredménye látható. Az oszlopok az egyes fejlődési állapotoknak megfelelő egyedek számának az összes vizsgált egyed számához viszonyított arányát mutatják.

A B részben a menekítés hatására bebábozódó, de aztán rendellenesen fejlődő bábok láthatók. Az 1., 3., 5. hasi, a 2., 4., 6. háti oldalról készült képek.

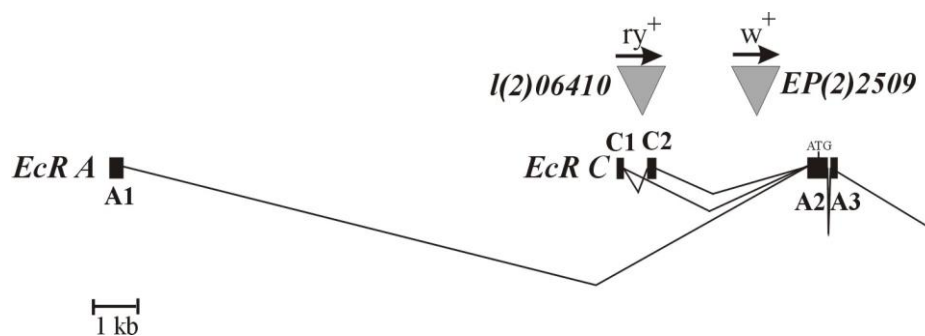
4.3. Az EcRA fehérjét kódoló izoformákat érintő EcR allélek**4.3.1. EcRA és EcRC izoformákat inaktíváló P-inszerciós allélek azonosítása**

Mint azt az előzőekben ismertettem, a letális fenotípusuk alapján azonosított nagyszámú P-inszerciós *EcR* allél mindegyike gátolja az *EcRB* izoformák kifejeződését. Olyan mutáns, mely kizárólag az EcRA fehérjét kódoló izoformákat (*EcRA* és *EcRC*) inaktíválná a letális fenotípus szűrésével nem bukkant fel. Ez az eredmény azt sugallta számunkra, hogy önmagában az EcRA fehérje hiánya valószínűleg nem okoz olyan mértékű

fejlődési rendellenességet, ami az állatok pusztulásához vezetne. Ha ez a feltételezés igaz, akkor az *EcRA* és *EcRC* izoformák környezetében lokalizálódó letális fenotípust nem mutató P-inszerciós mutánsok között érdemes az *EcRA* fehérje termelődését megakadályozó alléleket keresni.

A *Drosophila* genom nukleotid sorrendjének megismerése lehetővé tette P-inszerciók pontos lokalizálását, ha az inszercióval szomszédos DNS szakasz bázissorrendjét ismerjük. Adatbázisokban egyre több P-inszerciós törzzsel kapcsolatban érhető el ilyen irányú információ. Ez jó lehetőséget nyújtott számunkra ahhoz, hogy az ismert helyzetű P-inszerciók közül kikeresve az *EcR* gént területére lokalizálódókat, olyan új *EcR* allélekre bukkanjunk, melyek kizárólag az *EcRA* fehérje termelődését gátolják.

Az adatbázisok szűrésével két P-inszerciót találtunk, melyek az *EcRA* izoforma első intronjába ékelődnek, távol az *EcRB* izoformák transzkripció kezdőpontjától (16. ábra).



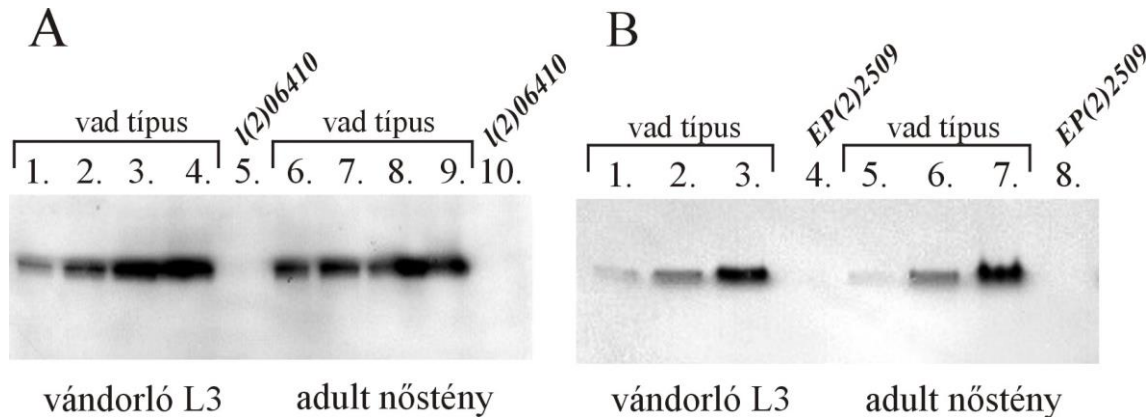
16. ábra. A *l(2)06410* és *EP(2)2509* inszerciók elhelyezkedése az *EcR* régióban.

Az ábrán az *EcRA* fehérjét kódoló izoformák specifikus exonjait tartalmazó genomi régió látható. A P-inszerciókat háromszögekkel jelöltük. Az inszerciók által hordozott szelekciót biztosító gének irányát nyilak jelzik.

Az *l(2)06410* PZ-inszerció, melyet a *long island expressway* (*lie*) gén egyetlen recesszív hímsteril, szemiletális alléljeként írtak le (Castrillon és mtsai, 1993) az *EcRC* izoforma első intronjában található. Az *EP(2)2509* azonosítójú EP-inszerció (Rorth, 1996) az *EcRC* izoforma második intronjában foglal helyet. A PZ-elem *rosy+* (*ry+*), az EP-elem *miniwhite* szelekciós markergént hordoz. Mindkét inszerció olyan orientációjú, hogy a bennük található szelekciót biztosító gén azonos irányú az *EcRA* és az *EcRC* izoformákkal, tehát a 4.2.4. fejezetben bemutatott mechanizmus szerint mindkét P-inszerció megakadályozhatja mind az *EcRA* mind az *EcRC* izoformák kifejeződését.

4.3.2. Az EcRA fehérjét kódoló izoformák kifejeződése az *l(2)06410* és az *EP(2)2509* mutánsokban

Annak tisztázására, hogy a *l(2)06410* és az *EP(2)250* P-inszerciók valóban gátolják az EcRA fehérje képződését, western blot és RT-PCR kísérleteket végeztünk. Western blot-tal nem tudtuk EcRA fehérjét kimutatni, sem a *l(2)06410* hemizigóta, sem az *EP(2)2509* homozigóta vándorló harmadik stádiumos lárvákban illetve adult nőstényekben. (17. ábra).



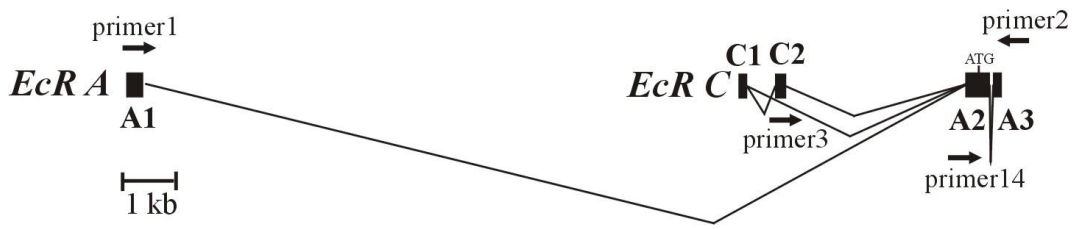
17. ábra. Az EcRA fehérje jelenléte a *l(2)06410* és *EP(2)2509* mutánsokban.

Az A részben *Df(2R)nap2 / +(OreR)* (vad típusú kontroll) vándorló harmadik stádiumos lárvákon (1., 2., 3., 4. minta) illetve adult nőstényeken (6., 7., 8., 9. minta), valamint *Df(2R)nap2 / l(2)06410* genotípusú vándorló harmadik stádiumos lárvákon (5. minta) és adult nőstényeken (10. minta) EcRA specifikus ellenanyaggal végzett western blot eredménye látható. A 4., 5., 9., 10. mintákban 1, a 3., 8. mintákban 0,5, a 2., 7. mintákban 0,25, az 1., 6. mintákban 0,125 állatnak megfelelő fehérjét vizsgáltunk.

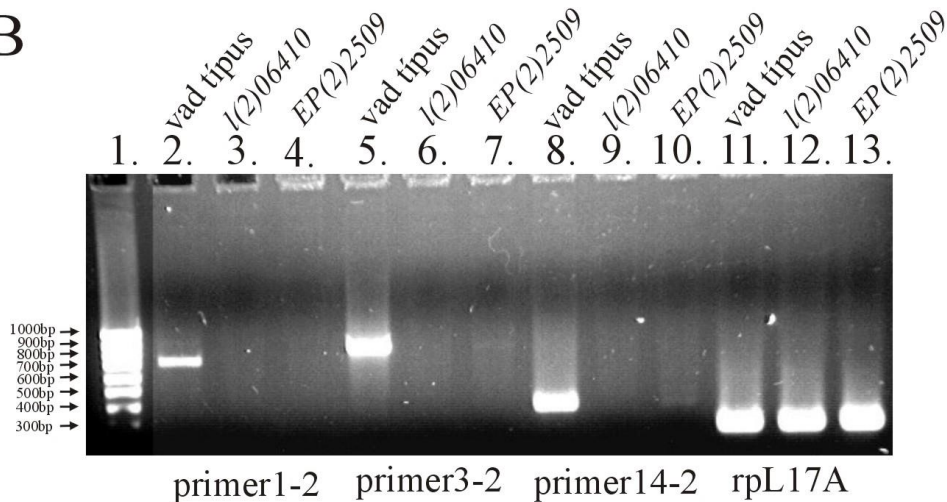
A B részben *+(OreR) / +(OreR)* (vad típusú kontroll) vándorló harmadik stádiumos lárvákon (1., 2., 3. minta) illetve adult nőstényeken (5., 6., 7. minta), valamint *EP(2)2509 / EP(2)2509* genotípusú vándorló harmadik stádiumos lárvákon (4. minta) és adult nőstényeken (8. minta) EcRA specifikus ellenanyaggal végzett western blot eredménye látható. A 3., 4., 7., 8. mintákban 1, a 2., 6. mintákban 0,5, a 1., 5. mintákban mintákban 0,25 állatnak megfelelő fehérjét vizsgáltunk.

Adult nőstényeken végzett RT-PCR kísérletekben nem volt kimutatható sem az EcRA, sem az EcRC izoformáról származó mRNS a *l(2)06410* hemizigóta egyedekben, míg az *EP(2)2509* homozigótákban elenyésző mennyiségben volt detektálható ilyen transzkriptum (18. ábra). A *l(2)06410* mutáns tehát gyakorlatilag amorf allélnek tekinthető mind az EcRA mind az EcRC izoformára nézve, az *EP(2)2509* pedig az amorfhoz közeli erős hipomorf allél.

A



B



18. ábra. Az *EcRA* és az *EcRC* izoformák kifejeződése a *l(2)06410* és *EP(2)2509* mutánsokban.
 Az A részben az *EcRA* fehérjét kódoló izoformák specifikus exonjait (A1, A2, A3, C1, C2) tartalmazó genomi régió látható. Az RT-PCR kísérletekben használt primereket nyilakkal jelöltük.
 A B rész $+(OreR) / +(OreR)$ vad típusú (2., 5., 8., 11. minta), *Df(2R)nap2 / l(2)06410* genotípusú (3., 6., 9., 12. minta), és *EP(2)2509/EP(2)2509* genotípusú (4., 7., 10., 13. minta) kifejlített nőstényeken végzett RT-PCR kísérletek eredményét mutatja. Az 1. minta mol. súly marker, a 2., 3., 4. minták az 1-2 primer párral (az *EcRA* izoformát detektáló), az 5., 6., 7., minták a 3-2 primer párral (az *EcRC* izoformát detektáló), a 8., 9., 10. minták a 14-2 primer párral (az *EcRA* és az *EcRC* izoformákat egyszerre detektáló), a 11., 12., 13. minták az L17AF-R (rpL17A riboszómális protein génre specifikus) primer párral végzett kísérletek eredményei

4.3.3Az *EcRA* specifikus allélek fenotípusa

A *l(2)06410* inszerciót a *lie* gén hímsteril, csökkent életképességet okozó alléljeként írták le, ezért első lépésként tisztáznunk kellett, hogy a *lie* gén azonos-e az *EcRA* izoformával. Komplementációs tesztekben igazoltuk, hogy az *EcRA* izoforma területére lokalizált *l(2)06410* inszerció független a *lie* géntől, mivel a *l(2)06410* inszerciós mutáns a csökkent életképesség és a hímsterilitás szempontjából is teljes komplementációt mutatott az *EcR* lókuszt eltávolító *Df(2R)nap2*, a *Df(2R)nap4* deléciókkal illetve az *EcR^{M554fs}* null alléllal

szemben. A *l(2)06410* törzsben a hímsterilitást és a csökkent életképességet okozó mutáció vagy mutációk tehát függetlenek az *EcR* régióban található P-inszerciótól.

Az *EcRA* fehérje hiányában kialakuló fenotípus leírásához, a *l(2)06410* és az *EP(2)2509* allélek *EcR* null alléllal (*EcR^{M554fs}*) szemben heterozigóta mutánsait vizsgáltuk. Mindkét allél életképessége megfelelt a vad típusban tapasztaltaknak (**5. táblázat**). A mutáns egyedek morfológiája nem mutatott semmiféle eltérést a vad típustól.

vizsgált genotípus	a kifejtett állapotot elérő egyedek (%)
<i>+(OreR) / EcR^{M554fs}</i>	92 +/- 7 (258 db)
<i>l(2)06410 / EcR^{M554fs}</i>	96 +/- 13 (198 db)
<i>EP(2)2509 / EcR^{M554fs}</i>	97 +/- 11 (197 db)

5. Táblázat. A *l(2)06410* és az *EP(2)2509* allélek letális fázisa

Az *EcR^{M554fs}/BcGla* x *l(2)06410/BcGla*, az *EcR^{M554fs}/BcGla* x *EP(2)2509/EP(2)2509*, valamint az *EcR^{M554fs}/BcGla* x *+(OreR)/+(OreR)* (vad típusú kontroll) keresztezésekből származó *Bc⁺Gla⁺* (*l(2)06410/EcR^{M554fs}*, *EP(2)2509/EcR^{M554fs}*, illetve *+(OreR)/EcR^{M554fs}*) és *BcGla* (*l(2)06410/BcGla*, *EP(2)2509/BcGla* vagy *EcR^{M554fs}/BcGla*, illetve *+(OreR)/BcGla*) kifejtett egyedek számát határoztuk meg. Minden esetben három párhuzamos kísérletet végeztünk. Az *l(2)06410* allél esetében a *Bc⁺Gla⁺* utódok számát a *BcGla* utódok 1/2-részéhez, az *EP(2)2509* allél és az *OreR* vad típusú kontroll esetében a *Bc⁺Gla⁺* utódok számát az összes *BcGla* utód számához viszonyítottuk. A táblázat a három-három párhuzamos kísérlet eredményének átlag és szórás értékeit tartalmazza %-ban kifejezve. Zárójelben a három párhuzamos keresztezésből származó *Bc⁺Gla⁺* utódok számának összege szerepel.

Megvizsgáltuk a *l(2)06410* és az *EP(2)2509* mutáns kifejtett hím és nőstény állatok fertilitását is. Ezekre a tulajdonságokra nézve sem tapasztaltunk szignifikáns eltérést a vad típustól (**6. és 7. táblázat**), kivéve, hogy a *l(2)06410 / EcR^{M554fs}* és az *EP(2)2509 / EcR^{M554f}* genotípusú nőstények által lerakott peték között magasabb számban voltak abnormális megjelenésűek (átlátszó, vagy kisebb fejletlen peték), és ezzel párhuzamosan olyan peték, melyekből nem keltek ki lárvák. A *l(2)06410 / EP(2)2509* genotípusú nőstények által lerakott peték esetében nem volt megfigyelhető különbség a ki nem kelő peték számában a vad típushoz képest. A *l(2)06410 / EcR^{M554fs}* és az *EP(2)2509 / EcR^{M554f}* genotípusú nőstények esetében tapasztalt jelenségre kétféle magyarázat is adható.

Lehetséges, hogy a *l(2)06410* allél annak ellenére, hogy a mutáns állatokban nem tudtunk kimutatni *EcRA* fehérjét, és *EcRA* és *EcRC* mRNS-t sem, mégsem gátolja teljes mértékben az *EcRA* fehérje termelődését. Ily módon érthető lenne, hogy az *l(2)06410* és az *EP(2)2509* hipomorf allélek az *EcR^{M554fs}* amorf alléllal alkotott heterozigóta állapotban

(*l(2)06410 / EcR^{M554fs}* és *EP(2)2509 / EcR^{M554f}*) erősebb fenotípust eredményeznek, mint ami az *l(2)06410 / EP(2)2509* heterozigótákra jellemző.

Valószínűbb magyarázatnak azonban azt tartjuk, hogy a petefészekben jelenlévő EcRA és EcRB fehérjék egymást kiegészítve működnek, és a *l(2)06410 / EcR^{M554fs}* és *EP(2)2509 / EcR^{M554f}* genotípusú nőtényekben tapasztalt fenotípus annak a következménye, hogy ezekben az állatokban az EcRA fehérje teljes hiánya mellett, az EcRB fehérjék mennyisége is lecsökken, mivel az *EcR^{M554fs}* az összes *EcR* izoformát inaktiváló null allél. Ezzel szemben, a *l(2)06410 / EP(2)2509* heterozigótákban az EcRB fehérjék mennyisége normális, és ez elegendő a tökéletes működéshez.

vizsgált nőtények genotípusa	egy nőtény által naponta lerakott peték száma (db)	ki nem kelt peték (%)
<i>EcR^{M554fs} / +(OreR)</i>	119 +/- 10	4 +/- 3
<i>l(2)06410 / +(OreR)</i>	110 +/- 12	8 +/- 6
<i>EP(2)2509 / +(OreR)</i>	115 +/- 14	4 +/- 4
<i>l(2)06410 / EP(2)2509</i>	114 +/- 19	5 +/- 7
<i>l(2)06410 / EcR^{M554fs}</i>	103 +/- 20	33 +/- 20
<i>EP(2)2509 / EcR^{M554fs}</i>	106 +/- 12	25 +/- 14

6. Táblázat. A *l(2)06410* és az *EP(2)2509* mutáns nőtények fertilitása

1 db vizsgálni kívánt genotípusú nőtényt 1 db vad típusú (*OreR*) hímekkel kereszteztünk, majd négy napon keresztül megállapítottuk a naponta lerakott, illetve a ki nem kelő peték számát. A táblázat 8-8 párhuzamos keresztezés eredményéből számított átlag és szórás értékeket tartalmazza.

vizsgált hímek genotípusa	egy nőtény által naponta lerakott peték száma (db)	ki nem kelt peték (%)
<i>EcR^{M554fs} / +(OreR)</i>	85 +/- 13	7 +/- 6
<i>l(2)06410 / +(OreR)</i>	84 +/- 11	5 +/- 4
<i>EP(2)2509 / +(OreR)</i>	85 +/- 14	7 +/- 6
<i>l(2)06410 / EP(2)2509</i>	79 +/- 13	4 +/- 3
<i>l(2)06410 / EcR^{M554fs}</i>	84 +/- 10	5 +/- 5
<i>EP(2)2509 / EcR^{M554fs}</i>	88 +/- 13	4 +/- 4

7. Táblázat. A *l(2)06410* és az *EP(2)2509* mutáns hímek fertilitása

1 db vizsgálni kívánt genotípusú hímeket 1 db vad típusú (*OreR*) nőténnyel kereszteztünk, majd négy napon keresztül megállapítottuk a naponta lerakott, illetve a ki nem kelő peték számát. A táblázat 8-8 párhuzamos keresztezés eredményéből számított átlag és szórás értékeket tartalmazza.

A fenotípus vizsgálat eredményeként tehát elmondható, hogy az EcRA fehérje nem nélkülözhetetlen a *Drosophila* egyedfejlődésében, a hiányában kialakuló egyedeken a laboratóriumi körülmények között felfedezhető rendellenesség nem alakul ki. Az EcRA fehérje hiányában egyedül a pete érésben mutatható ki kis mértékű rendellenesség.

5. MEGVITATÁS

A dolgozatomban szereplő kísérleteinkben a *Drosophila melanogaster EcR* gén izoformáinak szerepét vizsgáltuk P-inszerciós mutáns allélek segítségével, illetve egy új, eddig ismeretlen *EcR* izoforma azonosítása révén. A nagyszámú P-inszerciós *EcR* allél molekuláris jellemzése során, az *EcR* gén működésén túlmutató, általános érvényű jelenségre bukkantunk a P-inszerciók által kiváltott gén-inaktivációval kapcsolatban. A fejezet első részében ezzel a jelenséggel kapcsolatos megállapításainkat mutatom be, majd ezt követően három további alfejezetben tárgyalom az *EcR* izoformák funkciójára vonatkozó eredményeinket.

5.1. Intronban elhelyezkedő P-inszerciók az intron-kivágásban okoznak zavart

A P-inszerciós *EcR* allélek vizsgálata során egy általánosan érvényes mechanizmusra derült fény az intronba ékelődött mesterséges transzpozon inszerciók génműködés gátló hatásával kapcsolatban.

A letális mutánsgyűjteményben azonosított *P{lacW}* inszerciós *EcR* allélekben egy kivétellel (*P+12319*) az *EcRB* izoformák 5' szabályozó régiójában található a P-elemek. Ez a pozíció ugyanakkor az *EcRA* és az *EcRC* izoformák egyik intronjának felel meg. A *P+12319* allél által hordozott P-inszerció az *EcRB* izoformák tekintetében is intronban helyezkedik el. Ez az allél embrió letális, ami megegyezik az *EcR* gén közös régióját érintő *EcR* allélekben tapasztalt fenotípussal (Bender és mtsai, 1997), vagyis a *P+12319* inszerció az összes *EcR* izoformát inaktiválja. Az egyetlen ellentétes orientációjú inszerciót hordozó *P-9* allélen kívül egyik mutánsban sem tudtunk *EcRA* fehérjét kimutatni, tehát az intronban elhelyezkedő, az érintett génnel azonos orientációjú *P{lacW}* elem megakadályozza a gén kifejeződését, míg a fordított elhelyezkedés hatástalan ebből a szempontból. Két allél esetében (*P-40* és *P-191*²⁷) igazoltuk, hogy a *P{lacW}* elembe található *miniwhite* szelekciós marker gén felelős a génkifejeződés gátlásáért azáltal, hogy abnormális intron kivágódást generál, és egy *EcRA-miniwhite* kiméra mRNS jön létre.

A *l(2)k006210 (P-5738) EcR* P-inszercióval kapcsolatban, melynek molekuláris pozíciója a BDGP (Berkeley *Drosophila* Genome Project) révén is ismerté vált (Spradling és mtsai, 1995), Pier Paolo D'Avino és munkatársai northern hibridizáción alapuló kísérletekben szintén detektálni tudtak *EcRA-miniwhite* fúziós mRNS-t (D'Avino és mtsai, 2000).

A feltárt mechanizmus általános érvényűnek látszik. A *l(2)06410* és az *EP(2)2509* inszerciós allélek esetében is ezzel a folyamattal magyarázhatjuk az *EcRA* és az *EcRC* izoformák inaktiválódását. A *l(2)06410* P-inszerció *rosy*⁺ szelekciós marker gént hordoz, tehát nem kizárólag a *miniwhite* gén képes az említett folyamat előidézésére.

A *l(3)DTS-3* gén két általunk izolált *P{lacW}* inszerciós allélje esetében szintén kimutattuk, hogy kiméra mRNS képződése gátolja a gén kifejeződését (Még nem közölt saját eredmény).

Sinka Rita és mtsi. is ugyanerre a géninaktiváló mechanizmusra mutattak rá a *poirot* gén Hobo mesterséges transzpozon inszerciót hordozó alléljének vizsgálata során (Sinka és mtsai, 2002).

5.2. *EcRC* mRNS szinten új *EcR* izoforma, mely *EcRA* fehérjét kódol

A *Drosophila melanogaster EcR* gén hatalmas méretű (mintegy 80 kb hosszúságú DNS szakaszt fed le), és bonyolult szerkezetű. Alternatív promóter használat és alternatív mRNS érés eredményeként három különböző *EcR* transzkriptum illetve fehérje képződését igazolták (*EcRA*, *EcRB1* és *EcRB2*). Az egyes *EcR* izoformák által kódolt fehérjék csupán az N-terminális részükön különböznek egymástól. A DNS kötő doméntól kezdődően C-terminális irányban megegyeznek (Talbot és mtsai, 1993). A több különböző *EcR* izoforma létezése, és az *EcR* gén meglepően nagy mérete alapján jó eséllyel feltételezhető volt, hogy további, korábban nem azonosított *EcR* izoformák is létezhetnek.

A Berkeley *Drosophila* Genome Project (BDGP) által létrehozott EST adatbázis jó lehetőséget kínált számunkra új *EcR* izoformák azonosítására. Az adatbázisban található *EcR* gént érintő EST-k legnagyobb része valóban egy eddig ismeretlen *EcR* izoformát jelöl ki, melyet *EcRC*-nek neveztünk el. Az *EcRC* a többi ismert *EcR* izoformától elkülönülő transzkripció kezdőponttal rendelkezik, azonban terméke megegyezik az *EcRA* izoforma által kódolt fehérjével.

Ha az *EcRC* izoforma megismerése döntő mértékben nem is változtatja meg az *EcR* izoformákkal kapcsolatban kialakult képet, hiszen fehérje szinten továbbra is a korábban feltárt három *EcR* izoforma létezése igazolt, azonban az *EcRA* és az *EcRC* izoformák elkülönült transzkripció kezdőpontja az *EcRA* fehérje képződésének összetett szabályozására hívja fel a figyelmet. Ma még nem tisztázott, hogy mi a szerepe annak, hogy az *EcRA* fehérje két függetlenül szabályozott izoformáról is képződhet. Lehetséges, hogy csupán az *EcRA*

fehérje nagy mennyiségben történő termelődése valósul meg ily módon. Valószínűbb azonban, hogy az EcRA fehérjét kódoló izoformák időben és térben történő finoman szabályozott kifejeződésének van fontos, máig feltáratlan funkciója.

5.3. Az EcRA fehérje nem esszenciális a *Drosophila* egyedfejlődésben

Az általunk azonosított letális P-inszerciós *EcR* allélek, és a kizárólag az EcRA fehérjét kódoló izoformákat (*EcRA* és *EcRC*) inaktíváló P-inszerciós allélek segítségével választ adhatunk az EcRA fehérje funkcióját érintő több, máig tisztázatlan kérdésre.

Azok a mutánsok, melyekben mind a négy *EcR* izoforma inaktív, embrió állapotban pusztulnak el, míg az *EcRBI* illetve mindkét *EcRB* izoformát érintő allélek lárva letálisak (Bender és mtsai, 1997; Schubiger és mtsai, 1998). Ezek az adatok egyrészt arra utalhatnak, hogy az embrionális fejlődés során az EcRA fehérje szerepe esszenciális, azonban, az is lehetséges, hogy az embrionális fejlődéshez szükséges ekdizon receptor funkció ellátásához önmagában bármelyik izoforma elegendő, és a mutáns vonalakban nem az EcRA hánya vezet letalitáshoz, hanem az összes EcR izoforma együttes kiesése.

Az általunk azonosított letális P-inszerciós *EcR* allélek, a mind a négy EcR izoformát inaktíváló *P+12319* kivételével, mindannyian hipomorf allélnak tekinthetők a két *EcRB* izoformára nézve, ugyanakkor egy mutáns vonal kivételével (*P-9*) az EcRA fehérjét kódoló két izoformát tekintetve gyakorlatilag amorf allélekként viselkednek. A mind a négy *EcR* izoformát inaktíváló *P+12319* allél kivételével egyik inszerciós mutáns sem mutat embrió letalitást, tehát az a feltételezés, hogy az EcRA izoforma nélkülözhetetlen az embrionális fejlődéshez, egyértelműen elvethető.

Az általunk azonosított letális inszerciós allélek, eltérően az *EcRBI* és az *EcRBI-B2* közös mutánsoktól (Bender és mtsai, 1997; Schubiger és mtsai, 1998), nem mutatnak letalitást és fejlődési rendellenességeket a lárvális stádiumok során sem, tehát az EcRA fehérje az egyedfejlődésnek ebben a szakaszában sem esszenciális.

Az *EcR* izoformák szöveti kifejeződését vizsgálva a metamorfózis kezdetén William S. Talbot és munkatársai azt találták, hogy az imaginális szövetek egy részében (imágókorongok, és imaginális gyűrűk) az EcRA fehérje található nagy mennyiségben alacsony *EcRBI* szint mellett. Ebből arra következtettek, hogy az EcRA-nak meghatározó szerepe lehet az említett imaginális szövetek ekdizon szabályozott fejlődésében a metamorfózis során (Talbot és mtsai, 1993). A letális P-inszerciós *EcR* allélekkel kapcsolatos eredményeink cáfolják ezt a

feltételezést, ugyanis annak ellenére, hogy a *P-9* kivételével minden mutánsban hiányzik az EcRA fehérje, az egyes allélek esetében különböző mértékű imágó korong (láb) kitűrődést tapasztaltunk. A diszkusz kitűrődés mértéke az adott mutánsban jelenlévő EcRB fehérjék mennyiségével hozható kapcsolatba. A *P-9* mutánsban az EcRA protein megléte ellenére ugyanazon a szinten reked meg a láb imágó korongok fejlődése, mint az *EcRB* izoformák tekintetében legerősebb két allél (*P-25*, *P-40*) esetében. A *P-5738*, *EcRB* izoformákra nézve leggyengébb allélre homozigóta egyedek egy része (12 %) eléri a teljesen kifejlett állapotot (kikel a bábból). Ezen állatok többsége normálisan kifejlődött lábakkal rendelkezik, semmiféle láb deformációt nem mutat. Az EcRA fehérje hiányában tehát a lábak képesek tökéletesen kifejlődni.

A *P-5738* inszerció pontos lokalizációját a Berkeley *Drosophila* Genome Project (BDGP) is meghatározta, ily módon ez a törzs nyilvános törzsgyűjteményben más laboratóriumok számára is hozzáférhetővé vált. Pier Paolo D'Avino és Carl S. Thummel northern hibridizációval kimutatták, hogy a *P-5738* mutánsokban nem képződik *EcRA* mRNS, az *EcRB1* izoforma pedig csökkent mennyiségben van jelen (D'Avino és mtsai, 2000). A mutáns fenotípus vizsgálata során, az általunk tapasztaltakhoz hasonlóan, azt találták, hogy a homozigóta egyedek egy részéből kifejlődő felnőtt legyeken nem figyelhető meg semmiféle láb vagy szárny rendellenesség. Ezen eredmény alapján a szerzők közleményükben szintén megkérdőjelezzik az EcRA fehérje meghatározó szerepét az imágó korongok fejlődésében.

Két olyan P-inszerció allélt (*l(2)06410*, *EP(2)2509*) azonosítottunk, melyek közül a *l(2)06410* amorfnak tekinthető, az *EP(2)2509* amorfhoz közeli hipomorf allél mind az *EcRA*, mind az *EcRC* izoforma tekintetében. A *l(2)06410* és az *EP(2)2509* mutáns vonalak fenotípus vizsgálata azt mutatta, hogy az EcRA fehérje hiányában tökéletesen kifejlődött felnőtt egyedek keletkeznek. A két mutáció nem befolyásolja sem az állatok életképességét, sem a hímek fertilitását. Csupán a pete érésben fedezhető föl kis mértékű rendellenesség a a *l(2)06410/EcR^{M554fs}* és az *EP(2)2509/EcR^{M554fs}* mutánsokban. Valószínűleg ez a fenotípus nem az EcRA fehérje egyedüli hiányából adódik, hanem az EcRA fehérje hiányának és a az EcRB fehérjék csökkent mennyiségének (az *EcR^{M554fs}* minden *EcR* izoformát inaktiváló allél) együttes hatásaként alakul ki.

A bemutatott mutánsok fenotípusa alapján tehát úgy tűnik, hogy az EcRA fehérje nem esszenciális a *Drosophila*-ban. Érdekes azonban, hogy az EcRA fehérje jelen van minden fejlődési állapotban, illetve, hogy EcRA fehérje két egymástól függetlenül szabályozott *EcR* izoformáról is képződhet. Ezek alapján valószínű, hogy az EcRA fehérje szerepe nem csak abban merül ki, hogy hozzájárul egy szükségesnél magasabb, túlbiztosított állapotnak látszó,

ekdizon receptor szint kialakításához, hanem ezen kívül specifikus funkciója is lehetséges. Azon tény alapján, hogy az EcRA fehérje hiányában a laboratóriumi körülmények között nem tapasztalható fejlődési rendellenesség a *Drosophila*-ban, nem zárható ki egyértelműen, az EcRA fehérje fontos szerepe. Lehetséges pl., hogy az EcRA fehérje hiánya az állatok viselkedésében okoz változást, ami a természetben élő egyedek életét drasztikusan befolyásolhatja, de a laboratóriumban szokásos tenyésztési körülmények között esetleg nem eredményez detektálható eltérést a vad fenotípustól. Az állatok viselkedése elsősorban az idegrendszer működésével hozható kapcsolatba. Elképzelhető tehát, hogy az EcRA fehérje specifikus funkcióját az idegrendszer fejlődésében kell keresnünk. Ezzel összhangban vannak azok a megfigyelések, miszerint a központi idegrendszerben kb. 300 neuron egy nagyságrenddel magasabb szinten termel EcRA fehérjét a metamorfózis időszakában, mint a többi idegsejt, és ezek a sejtek, melyek egy részéről igazolták, hogy lárvális izmok beidegzésében szerepet játszó mozgató neuronok, azonos sorssal rendelkeznek, röviddel az állatok bábból való kikéltése után programozott sejthalál következtében elpusztulnak (Robinow és mtsai, 1993).

5.4. Az EcR izoformák képesek egymást helyettesíve működni

Az EcR izoformák funkciójával kapcsolatban két ellentétes nézet áll egymással szemben.

William S. Talbot és munkatársai azon megfigyeléseikre alapozva, miszerint a metamorfózis kezdetén az *EcRA* és az *EcRB1* izoformák szöveti kifejeződése eltérő (Az imágó korongokban és az imaginális gyűrűkben EcRA fehérje mutatható ki nagy mennyiségben alacsony EcRB1 szint mellett, ezzel szemben a politén sejteket tartalmazó lárvális szövetekben, az ekdizon termelésért felelős gyűrűmirigy kivételével, az EcRA szintje alacsony és az EcRB1 fehérje termelődik nagy mennyiségben, míg a hisztoblasztok sejteiben csak EcRB1 protein található, EcRA nem.), arra a következtetésre jutottak, hogy egy adott szövetféleség sorsát a metamorfózis során nagymértékben az határozza meg, hogy milyen *EcR* izoforma eloszlást mutat, vagyis az egyes izoformáknak önálló elkülönült funkciót tulajdonítottak (Talbot és mtsai, 1993). Ezzel az elmélettel összhangban vannak Jean-Francois Mouillet és munkatársai által közölt eredmények (Mouillet és mtsai, 2001). A szerzők HeLa sejt kultúrában a különböző *EcR* izoformák jelenlétében ekdizonnal indukálható riporter gén kifejeződését mérve azt tapasztalták, hogy az egyes izoformák transzkripció aktiváló

képessége jelentősen eltér. Kimutatták továbbá, hogy az EcRA izoforma A/B doménje (Az egyes EcR izoformák csupán az N-terminális A/B doménben különböznek egymástól) autonóm génkifejeződés-gátló funkcióval rendelkezik, szemben a két EcRB izoforma aktiváló hatású A/B doménjével.

Az *EcR* izoformák specifikus funkcióját hangsúlyozó elmélettel szemben álló nézet szerint a különböző *EcR* izoformák egymást helyettesítve képesek működni. Ezt azon kísérletek eredményei támasztják alá, melyekben transzgenként külön-külön kifejeztetve az egyes *EcR* izoformákat menekíteni tudták mind az *EcRBI* specifikus mutációk, mind az amorf (a négy izoformát egyszerre inaktíváló) *EcR* allélek letális fenotípusát (Bender és mtsai, 1997; Li és mtsai, 2000).

Az általunk azonosított új *EcR* allélek nagyban hozzájárulnak a kérdés tisztázásához. Fenotípus jellemzésük, és fenotípusuk összevetése a korábbról ismert *EcR* mutánsok fenotípusával az *EcR* izoformák egymást helyettesítő szerepével kapcsolatban szolgáltatnak támogató adatokat az egyedfejlődés három stádiumában, az embrionális állapotban, a lárva stádiumokban, és a metamorfozis időszakában.

Az *EcR* izoformák szerepére vonatkozó következtetéseink részletes bemutatását az említett három fejlődési állapotnak megfelelően három részre bontva tárgyalom.

5.4.1. Az *EcR* izoformák szerepe az embrionális fejlődésben

Az embrionális fejlődés során egyik *EcR* izoformának sincs önmagában nélkülözhetetlen szerepe. Az összes izoformát egyszerre inaktíváló mutációk okoznak csak embrió letalitást (Bender és mtsai, 1997). Ezzel szemben az embrionális fejlődés zavartalanul végbemegy azon mutánsokban, melyekben az EcRB1 (Bender és mtsai, 1997) fehérje hiányzik, illetve ha mindkét EcRB izoforma működésképtelen (Schubiger és mtsai, 1998). Azokban az általunk azonosított P-inszerciós mutánsokban, melyek csökkent mennyiségben tartalmazzák mindkét EcRB fehérjét az EcRA teljes hiánya mellett (*P-9*, *P-25*, *P-40*, *P-191*²⁷, *P-1319* és *P-5738*), illetve melyek kizárólag az EcRA fehérje termelődését gátolják (*I(2)06410* és *EP(2)2509*), szintén normálisan lejátszódik az embrionális fejlődés. Az embrió állapotban tehát az egyes izoformák képesek egymást helyettesítve, ugyanazt a funkciót ellátni. Az egyedfejlődésnek ebben a szakaszában az ekdizon receptor fehérje mennyiségét tekintve „túlbiztosított” állapot alakul ki, amikor anyai hatású géntermékként is jelen van, és

zigótikusan is képződik *EcRA* mRNS és fehérje, valamint zigótikusan az *EcRB1* és az *EcRB2* izoformák is kifejeződnek (Talbot és mtsai, 1993).

5.4.2. Az *EcR* izoformák szerepe a lárvális fejlődésben

A lárv állapotban az ecdizon szerepe elsősorban a vedlések szabályozására korlátozódik. Ezzel összhangban az *EcR* mutáns lárvákban a vedlés elmaradása illetve vedlési rendellenességek figyelhetők meg.

Azok az általunk azonosított letális P-inszerciós *EcR* allélek (*P-9*, *P-25*, *P-40*, *P-191*²⁷, *P-1319* és *P-5738*), melyekben az *EcRA* fehérje hiányzik, az *EcRB1* és az *EcRB2* fehérjéket pedig csökkent mennyiségben tartalmazzák, nem mutatnak lárvaletalitást. A mutáns egyedek mindegyike eléri a harmadik lárv stádium végét. Az *EcRA* fehérjét kódoló izoformákat inaktiváló mutánsokban (*I(2)06410* és *EP(2)2509*) szintén normálisan lezajlik a lárvális fejlődés. Az *EcRB1* specifikus mutánsok 40-60%-a jut el a harmadik lárv stádiumba (L3). Az L3 stádiumot el nem érő állatok zöme második stádiumos lárvaként (L2) pusztul el (Bender és mtsai, 1997; Schubiger és mtsai, 1998). A két *EcRB* izoformát egyszerre inaktiváló allélek szintén lárv letálisak. A mutáns egyedek főként első stádiumos lárvaként (L1) pusztulnak el, az L3 stádiumot alléltól függően 0-23%-ban érik csak el. Az elpusztuló lárvák többsége jellegzetes fenotípust mutat. Egyszerre megtalálható bennük az előző lárv stádiumra jellemző régi, és az újonnan kialakuló szájszerv és trachea végződés, jelezve, hogy a fejlődésük vedlés közben akadt el (Schubiger és mtsai, 1998). Abban az esetben, ha minden izoforma hiányzik (*EcR* null mutáns egyedeket hősoikk indukált *EcR* transzgen segítségével átsegítették az embrió állapoton, majd további hősokkot nem alkalmaztak) a mutáns lárvák mindegyike megreked L1-ben, és néhány nap múlva vedlés nélkül elpusztul. Az elpusztuló állatok nagy részére jellemző a fent említett „dupla szájszerv és trachea végződés” fenotípus, tehát a vedlés elkezdődik bennük, de nem tud normálisan lezajlani (Li és mtsai, 2000). A vedlés megindulását ezekben az állatokban azzal magyarázhatjuk, hogy a hősokk promotor, ami a menekítő *EcR* cDNS-ek kifejeződését biztosítja, alacsony szinten hőindukció nélkül is működik, és az így keletkező minimális mennyiségű *EcR* fehérje biztosíthatja a vedléshez vezető ecdizon szabályozott folyamatok kis mértékű aktiválódását. Ha a menekítő *EcR* transzgent az embrió állapoton túl is kifejeztették, az *EcR* null mutánsok átjuttathatók voltak L2, illetve a L3 stádiumba is. A menekítés megszüntetése az L2 stádiumos lárvák esetében is

ugyanazt eredményezte, mint L1-ben, azaz az összes mutáns egyed fejlődése elakadt az L2 stádium végén (Li és mtsai, 2000).

Az említett menekítési kísérletekben az egyes *EcR* izoformák külön-külön is képesek voltak az összes izoforma együttes hiányát kompenzálni, és átsegíteni az állatokat a lárvális vedléseken (Li és mtsai, 2000). Az *EcR* izoformák szerepével kapcsolatban tehát nyilvánvalóan kizárható az a lehetőség, hogy a lárvális fejlődés során az egyes izoformák önálló funkcióval rendelkeznek, és nem képesek egymást helyettesíteni.

A bemutatott mutáns fenotípusok is az izoformák kölcsönös helyettesítő képességére utalnak. Az *EcRA* fehérje szerepe például nyilvánvalóan redundáns (hiányában nem észlelhető semmiféle rendellenesség), azonban részvétele a lárvális vedlések szabályozásában egyértelműen kimutatható, ha az *EcRB* izoformákat eltávolítva hasonlítjuk össze az *EcRA* jelenlétében, illetve hiányában kialakuló fenotípusokat (A két *EcRB* izoformát inaktíváló mutáció gyengébb fenotípust eredményez, mint az összes izoforma hiánya). Együtt a két *EcRB* fehérje tehát képes, az *EcRA* hiányában is, teljes egészében biztosítani a vedlések ekdizon receptor szükségletét, ugyanakkor az *EcRB* fehérjéket helyettesítve bizonyos mértékben az *EcRA* is be tudja tölteni ezt a szerepet.

5.4.3. Az *EcR* izoformák szerepe a metamorfózisban

A metamorfózis időszakában megfigyelt *EcR* mutáns fenotípusok szintén az izoformák egymást helyettesítő szerepét támasztják alá. Ebben a fejlődési állapotban a különböző *EcR* mutánsok hasonló fenotípust mutatnak. A mutáns lárvák elérve a harmadik lárva stádium végét bábozódás nélkül pusztulnak el. A mutáció hatása minden mutánsban az egész testet érinti, nem korlátozódik csupán bizonyos szövetekre. A mutáns lárvák szöveteiben általában elindulnak a metamorfózis kezdetére jellemző változások, az egyes allélek között abban van csupán különbség, hogy ezek a folyamatok a fejlődés mely szintjén rekednek meg (Bender és mtsai, 1997; Schubiger és mtsai, 1998; Li és mtsai, 2000).

Az *EcRA* fehérje ebben az életszakaszban is redundáns, kiesése (*l(2)06410* és *EP(2)2509* allélek) nem okoz letálatást.

Az összes *EcR* izoforma együttes hiánya (*EcR* amorf allél menekítéssel átsegítve a korábbi fejlődési stádiumokon) (Li és mtsai, 2000) eredményezi a legsúlyosabb fenotípust. Ezekben a mutánsokban az ekdizon szabályozott folyamatok közül csak az imágókorongok kitürődése, és a vakbelek rövidülése figyelhető meg, és ezek a változások kb.2 órával a

bábozódás utáni állapotban (a többi mutánshoz képest legkorábban) akadnak el. Az ekdizon szabályozott folyamatok elkezdődése ezekben a mutánsokban szintén magyarázható azzal, hogy a menekítő *EcR* cDNS átíródását biztosító hősook promoter alacsony szinten indukció nélkül is működik.

Az általunk azonosított letális P-inszerciós allélekre, a *P-9* és az összes izoformát inaktíváló *P+12319* kivételével, az *EcRA* teljes hiánya, és a két *EcRB* csökkent mennyisége jellemző. Fenotípusuk alapján ezek az allélek hipomorf sorba rendezhetők. Az allél erősségük attól függ, hogy az illető mutáció milyen mértékben gátolja a két *EcRB* izoforma kifejeződését. A *P-9* allél, mely a két legerősebb P-inszerciós allélhez (*P-25*, *P-40*) hasonlóan az *EcRB* izoformák transzkripció kezdőpontjának közvetlen közelében hordozza a P-inszerciót (a két *EcRB* izoformát feltehetően ugyanolyan mértékben inaktíválja mint a *P-25* vagy a *P-40*, azonban velük ellentétben az *EcRA* fehérje termelődését nem gátolja), az említett két allélnél gyengébb fenotípust mutat az elpusztuló mutáns lárvák testalakját, és a középbél megrövidülését tekintve. A *P-9* allél eltérő viselkedése arra utal, hogy az *EcRA* fehérje redundáns funkciója ellenére, részt vesz a metamorfozis kezdetén lezajló ekdizon indukált folyamatok szabályozásában. Ugyanezt támasztja alá, hogy a két *EcRB* izoforma hiányában enyhébb fenotípus tapasztalható az imágó korongok kitűródésében (Schubiger és mtsai, 1998), mint az összes *EcR* izoforma együttes inaktíválásakor (Li és mtsai, 2000).

A bemutatott mutáns fenotípusok összevetése alapján, végső soron azt a következtetést vonhatjuk le, hogy az egyes izoformákhoz nem rendelhető szövetspecifikus esszenciális funkció, és a különböző allélek fenotípusának erősségét minden jel szerint az határozza meg, hogy az illető mutánsban mennyi *EcR* fehérje található.

A letális P-inszerciós alléleken végzett menekítési kísérleteink, szintén az *EcR* izoformák egymást helyettesítő képességét támasztják alá, hiszen az *EcR* izoformákat hősook promóter által szabályozott transzgenként kifejeztetve, az egyes izoformák külön-külön is képesek voltak menekíteni a mutánsok letális fenotípusát.

Az egyes allélek menekíthetősége úgy tűnik, attól függ, hogy az illető allél milyen mennyiségű *EcR* fehérjét tartalmaz. A kísérletek során a leggyengébb (*P-5738*) allél menekült leghatékonyabban. A legerősebb fenotípust mutató allélek (*P-25* és *P-40*) letális fenotípusát nem menekítette, ha a harmadik lárvá stádium végén egyetlen hősookkal indukáltuk az *EcR* transzgenek átíródását, azonban a bábozódás után néhány órával újabb hősookot alkalmazva ezen allélek mutáns egyedei is elérték a kifejllett állapotot. A *P-9* allél ezekben a kísérletekben is kivételesen viselkedett, egyetlen hősook alkalmazásával is menekíthető volt, igaz alacsonyabb szinten, mint a távolabbi inszerciókat hordozó gyengébb allélek. Ez az eredmény

is alátámasztja, az EcRA fehérje részvételét a metamorfózis időszakában lejátszódó folyamatokban.

Az *EcRB* izoformákhoz képest az *EcRA* izoforma csak kb. 50%-os hatékonysággal menekített. Michael Bender és munkatársai is hasonló eredményről számoltak be az *EcRB1* specifikus allél menekítése során (Bender és mtsai, 1997). Az összes EcR izoformát egyszerre inaktíváló alléleken végzett menekítési kísérletekben, ahol a lárvális vedlések elmaradását kompenzálták a különböző *EcR* izoformák kifejeztetésével szintén különbséget tapasztaltak az egyes izoformák menekítő képességében (Li és mtsai, 2000). Ezek az eredmények egyrészt utalhatnak arra, hogy az egyes *EcR* izoformák funkciója bizonyos mértékben elkülönült, azaz bizonyos folyamatokban egyik, másokban másik izoforma szerepe meghatározó, egymás helyettesítésére pedig csak alacsonyabb hatékonysággal képesek, azonban az eltérő menekítő képesség adódhat abból is, hogy az egyes *EcR* izoformáknak megfelelő transzgénekről eltérő mennyiségű fehérje termelődik, vagy a képződő mRNS-ek vagy fehérjék stabilitása különbözik. Ily módon az említett menekítési kísérletek eredményei alapján nem zárható ki az sem, hogy az *EcR* izoformák teljes mértékben képesek egymást kölcsönösen helyettesíteni.

Összefoglalva az *EcR* izoformák szerepével kapcsolatos ismereteinket, elmondható, hogy az egyes izoformák egymást helyettesítő működése az embrionális fejlődés során, a lárva állapotokban és a metamorfózis időszakában is egyértelműen bizonyított. Csupán a kölcsönös helyettesítő képesség mértékével kapcsolatban létezik bizonytalanság. E kérdés teljes körű tisztázásához nagy segítséget jelentene, ha ismernénk az *EcRB2* fehérje hiányában kialakuló fenotípust, illetve léteznének olyan allélek, melyek egyszerre inaktíválják vagy az *EcRA* és az *EcRB1*, vagy az *EcRA* és az *EcRB2* fehérjéket kódoló izoformákat. Az *EcR* izoformákat minden lehetséges kombinációban inaktíváló allélek fenotípusát és a mutáns szövetek sejtjeinek EcR fehérje tartalmát összevetve, eldönthető lenne, hogy az egyes izoformák teljes mértékben képesek-e egymást helyettesíteni, mivel ebben az esetben a kialakuló fenotípus kizárólag az illető mutánsban található EcR fehérje mennyiségétől függne.

Olyan menekítési kísérletek, melyekben az egyik *EcR* izoforma szabályozó régióját használva fejeltetnénk ki egy másik izoformát, szintén hasznosak lennének az említett bizonytalanságok tisztázásához, azonban az *EcR* gén hatalmas mérete, és ebből adódóan feltehetőleg kiterjedt, eddig részleteiben még felderítetlen szabályozó régiója miatt, egyelőre ez a megoldás is nehezen megvalósítható. Emellett, a különböző izoformákról származó mRNS-ek esetleges eltérő stabilitásának kérdését ez a megközelítési mód sem küszöbölné ki.

IRODALOMJEGYZÉK

1. **Altmann T.** 1998. A tale of dwarfs and drugs: brassinosteroids to the rescue. *Trends Genet.* **14**: 490-495.
2. **Andres A. J., Fletcher J. C., Karim F. D., and Thummel C. S.** 1993. Molecular analysis of the initiation of insect metamorphosis: a comparative study of *Drosophila* ecdysteroid-regulated transcription. *Dev.Biol.* **160**: 388-404.
3. **Andres A. J. and Thummel C. S.** 1995. The *Drosophila* 63F early puff contains E63-1, an ecdysone-inducible gene that encodes a novel Ca(2+)-binding protein. *Development* **121**: 2667-2679.
4. **Arbeitman M. N. and Hogness D. S.** 2000. Molecular chaperones activate the *Drosophila* ecdysone receptor, an RXR heterodimer. *Cell* **101**: 67-77.
5. **Ashburner M.** 1967. Patterns of puffing activity in the salivary gland chromosomes of *Drosophila*. I. Autosomal puffing patterns in a laboratory stock of *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma* **21**: 398-428.
6. **Ashburner M., Chihara C., Meltzer P., and Richards G.** 1974. Temporal control of puffing activity in polytene chromosomes. *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.* **38**: 655-662.
7. **Ashburner M. and Richards G.** 1976. Sequential gene activation by ecdysone in polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster*. III. Consequences of ecdysone withdrawal. *Dev.Biol.* **54**: 241-255.
8. **Baehrecke E. H. and Thummel C. S.** 1995. The *Drosophila* E93 gene from the 93F early puff displays stage- and tissue-specific regulation by 20-hydroxyecdysone. *Dev.Biol.* **171**: 85-97.
9. **Bai J., Uehara Y., and Montell D. J.** 2000. Regulation of invasive cell behavior by taiman, a *Drosophila* protein related to AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast cancer. *Cell* **103**: 1047-1058.
10. **Baniahmad A., Ha I., Reinberg D., Tsai S., Tsai M. J., and O'Malley B. W.** 1993. Interaction of human thyroid hormone receptor beta with transcription factor TFIIB may mediate target gene derepression and activation by thyroid hormone. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **90**: 8832-8836.
11. **Baniahmad A., Steiner C., Kohne A. C., and Renkawitz R.** 1990. Modular structure of a chicken lysozyme silencer: involvement of an unusual thyroid hormone receptor binding site. *Cell* **61**: 505-514.
12. **Barettino D., Vivanco Ruiz M. M., and Stunnenberg H. G.** 1994. Characterization of the ligand-dependent transactivation domain of thyroid hormone receptor. *EMBO J.* **13**: 3039-3049.
13. **Baumann C. T., Maruvada P., Hager G. L., and Yen P. M.** 2001. Nuclear cytoplasmic shuttling by thyroid hormone receptors. multiple protein interactions are required for nuclear retention. *J.Biol.Chem.* **276**: 11237-11245.
14. **Beato M., Herrlich P., and Schutz G.** 1995. Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell* **83**: 851-857.
15. **Belyaeva E. S., Aizenzon M. G., Semeshin V. F., Kiss I. I., Koczka K., Baritcheva E. M., Gorelova T. D., and Zhimulev I. F.** 1980. Cytogenetic analysis of the 2B3-4--2B11 region of the X-chromosome of *Drosophila melanogaster*. I. Cytology of the region and mutant complementation groups. *Chromosoma* **81**: 281-306.

16. **Belyaeva E. S., Vlassova I. E., Biyasheva Z. M., Kakpakov V. T., Richards G., and Zhimulev I. F.** 1981. Cytogenetic analysis of the 2B3-4-2B11 region of the X chromosome of *Drosophila melanogaster*. II. Changes in 20-OH ecdysone puffing caused by genetic defects of puff 2B5. *Chromosoma* **84**: 207-219.
17. **Bender M., Imam F. B., Talbot W. S., Ganetzky B., and Hogness D. S.** 1997. *Drosophila* ecdysone receptor mutations reveal functional differences among receptor isoforms. *Cell* **91**: 777-788.
18. **Bier E., Vaessin H., Shepherd S., Lee K., McCall K., Barbel S., Ackerman L., Carretto R., Uemura T., Grell E., and .** 1989. Searching for pattern and mutation in the *Drosophila* genome with a P-lacZ vector. *Genes Dev* **3**: 1273-1287.
19. **Billas I. M., Moulinier L., Rochel N., and Moras D.** 2001. Crystal structure of the ligand-binding domain of the ultraspiracle protein USP, the ortholog of retinoid X receptors in insects. *J.Biol.Chem.* **276**: 7465-7474.
20. **Biyasheva A., Do T. V., Lu Y., Vaskova M., and Andres A. J.** 2001. Glue secretion in the *Drosophila* salivary gland: a model for steroid-regulated exocytosis. *Dev.Biol.* **231**: 234-251.
21. **Blanco J. C., Wang I. M., Tsai S. Y., Tsai M. J., O'Malley B. W., Jurutka P. W., Haussler M. R., and Ozato K.** 1995. Transcription factor TFIIB and the vitamin D receptor cooperatively activate ligand-dependent transcription. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **92**: 1535-1539.
22. **Bourguet W., Ruff M., Chambon P., Gronemeyer H., and Moras D.** 1995. Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR-alpha. *Nature* **375**: 377-382.
23. **Bownes M., Shirras A., Blair M., Collins J., and Coulson A.** 1988. Evidence that insect embryogenesis is regulated by ecdysteroids released from yolk proteins. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **85**: 1554-1557.
24. **Broadus J., McCabe J. R., Endrizzi B., Thummel C. S., and Woodard C. T.** 1999. The *Drosophila* beta FTZ-F1 orphan nuclear receptor provides competence for stage-specific responses to the steroid hormone ecdysone. *Mol Cell* **3**: 143-149.
25. **Brzozowski A. M., Pike A. C., Dauter Z., Hubbard R. E., Bonn T., Engstrom O., Ohman L., Greene G. L., Gustafsson J. A., and Carlquist M.** 1997. Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature* **389**: 753-758.
26. **Burtis K. C., Thummel C. S., Jones C. W., Karim F. D., and Hogness D. S.** 1990. The *Drosophila* 74EF early puff contains E74, a complex ecdysone-inducible gene that encodes two ets-related proteins. *Cell* **61**: 85-99.
27. **Buszczak M., Freeman M. R., Carlson J. R., Bender M., Cooley L., and Segraves W. A.** 1999. Ecdysone response genes govern egg chamber development during mid-oogenesis in *Drosophila*. *Development* **126**: 4581-4589.
28. **Buszczak M. and Segraves W. A.** 1998. *Drosophila* metamorphosis: the only way is USP? *Curr.Biol.* **8**: R879-R882.
29. **Carney G. E. and Bender M.** 2000. The *Drosophila* ecdysone receptor (EcR) gene is required maternally for normal oogenesis. *Genetics* **154**: 1203-1211.
30. **Carney G. E., Wade A. A., Sapra R., Goldstein E. S., and Bender M.** 1997. DHR3, an ecdysone-inducible early-late gene encoding a *Drosophila* nuclear receptor, is required for embryogenesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **94**: 12024-12029.
31. **Castrillon D. H., Gonczy P., Alexander S., Rawson R., Eberhart C. G., Viswanathan S., DiNardo S., and Wasserman S. A.** 1993. Toward a molecular genetic analysis of spermatogenesis in

Drosophila melanogaster: characterization of male-sterile mutants generated by single P element mutagenesis. *Genetics* **135**: 489-505.

32. **Chavez V. M., Marques G., Delbecq J. P., Kobayashi K., Hollingsworth M., Burr J., Natzle J. E., and O'Connor M. B.** 2000. The *Drosophila* disembodied gene controls late embryonic morphogenesis and codes for a cytochrome P450 enzyme that regulates embryonic ecdysone levels. *Development* **127**: 4115-4126.
33. **Chen J. D. and Evans R. M.** 1995. A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* **377**: 454-457.
34. **Christianson A. M., King D. L., Hatzivassiliou E., Casas J. E., Hallenbeck P. L., Nikodem V. M., Mitsialis S. A., and Kafatos F. C.** 1992. DNA binding and heteromerization of the *Drosophila* transcription factor chorion factor 1/ultraspiracle. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **89**: 11503-11507.
35. **Ciana P., Braliou G. G., Demay F. G., von Lindern M., Barettino D., Beug H., and Stunnenberg H. G.** 1998. Leukemic transformation by the v-ErbA oncoprotein entails constitutive binding to and repression of an erythroid enhancer in vivo. *EMBO J.* **17**: 7382-7394.
36. **D'Avino P. P. and Thummel C. S.** 1998. crooked legs encodes a family of zinc finger proteins required for leg morphogenesis and ecdysone-regulated gene expression during *Drosophila* metamorphosis. *Development* **125**: 1733-1745.
37. **D'Avino P. P. and Thummel C. S.** 2000. The ecdysone regulatory pathway controls wing morphogenesis and integrin expression during *Drosophila* metamorphosis. *Dev Biol* **220**: 211-224.
38. **Dalman F. C., Koenig R. J., Perdew G. H., Massa E., and Pratt W. B.** 1990. In contrast to the glucocorticoid receptor, the thyroid hormone receptor is translated in the DNA binding state and is not associated with hsp90. *J.Biol.Chem.* **265**: 3615-3618.
39. **Dalman F. C., Sturzenbecker L. J., Levin A. A., Lucas D. A., Perdew G. H., Petkovitch M., Chambon P., Grippo J. F., and Pratt W. B.** 1991. Retinoic acid receptor belongs to a subclass of nuclear receptors that do not form "docking" complexes with hsp90. *Biochemistry* **30**: 5605-5608.
40. **Danielian P. S., White R., Lees J. A., and Parker M. G.** 1992. Identification of a conserved region required for hormone dependent transcriptional activation by steroid hormone receptors. *EMBO J.* **11**: 1025-1033.
41. **Darimont B. D., Wagner R. L., Apriletti J. W., Stallcup M. R., Kushner P. J., Baxter J. D., Fletterick R. J., and Yamamoto K. R.** 1998. Structure and specificity of nuclear receptor-coactivator interactions. *Genes Dev.* **12**: 3343-3356.
42. **Deák P., Zavorszky P., and Maroy P.** 1988. Moulting hormone regulates its receptor level in *Drosophila Melanogaster*. *Insect Biochemistry* **18**.
43. **DeFranco D. B., Ramakrishnan C., and Tang Y.** 1998. Molecular chaperones and subcellular trafficking of steroid receptors. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* **65**: 51-58.
44. **DiBello P. R., Withers D. A., Bayer C. A., Fristrom J. W., and Guild G. M.** 1991. The *Drosophila* Broad-Complex encodes a family of related proteins containing zinc fingers. *Genetics* **129**: 385-397.
45. **Dressel U., Thormeyer D., Altincicek B., Paululat A., Eggert M., Schneider S., Tenbaum S. P., Renkawitz R., and Baniahmad A.** 1999. Alien, a highly conserved protein with characteristics of a corepressor for members of the nuclear hormone receptor superfamily. *Mol.Cell Biol.* **19**: 3383-3394.
46. **Durand B., Saunders M., Gaudon C., Roy B., Losson R., and Chambon P.** 1994. Activation function 2 (AF-2) of retinoic acid receptor and 9-cis retinoic acid receptor: presence of a conserved autonomous constitutive activating domain and influence of the nature of the response element on AF-2 activity. *EMBO J.* **13**: 5370-5382.

47. **Emery I. F., Bedian V., and Guild G. M.** 1994. Differential expression of Broad-Complex transcription factors may forecast tissue-specific developmental fates during *Drosophila* metamorphosis. *Development* **120**: 3275-3287.
48. **Fejes-Toth G., Pearce D., and Naray-Fejes-Toth A.** 1998. Subcellular localization of mineralocorticoid receptors in living cells: effects of receptor agonists and antagonists. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **95**: 2973-2978.
49. **Fisk G. J. and Thummel C. S.** 1998. The DHR78 nuclear receptor is required for ecdysteroid signaling during the onset of *Drosophila* metamorphosis. *Cell* **93**: 543-555.
50. **Fletcher J. C., Burtis K. C., Hogness D. S., and Thummel C. S.** 1995a. The *Drosophila* E74 gene is required for metamorphosis and plays a role in the polytene chromosome puffing response to ecdysone. *Development* **121**: 1455-1465.
51. **Fletcher J. C., D'Avino P. P., and Thummel C. S.** 1997. A steroid-triggered switch in E74 transcription factor isoforms regulates the timing of secondary-response gene expression. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **94**: 4582-4586.
52. **Fletcher J. C. and Thummel C. S.** 1995b. The *Drosophila* E74 gene is required for the proper stage- and tissue-specific transcription of ecdysone-regulated genes at the onset of metamorphosis. *Development* **121**: 1411-1421.
53. **Fondell J. D., Roy A. L., and Roeder R. G.** 1993. Unliganded thyroid hormone receptor inhibits formation of a functional preinitiation complex: implications for active repression. *Genes Dev.* **7**: 1400-1410.
54. **Freeman M. R., Dobritsa A., Gaines P., Segraves W. A., and Carlson J. R.** 1999. The dare gene: steroid hormone production, olfactory behavior, and neural degeneration in *Drosophila*. *Development* **126**: 4591-4602.
55. Fristrom, D. and J.W.Fristrom. 1993. The metamorphic development of adult epidermis. In *In the Development of Drosophila melanogaster* (ed. M.Bate and A.Martinez-Arias), pp. 843-898. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
56. **Fristrom D. K., Fekete E., and Fristrom J. W.** 1981. Imaginal disk development in a non-pupariating lethal mutant in *Drosophila melanogaster*. *ROUX ARCH DEV BIOL* **1**: 11-21.
57. **Fristrom J. W., Doctor J., Fristrom D. K., Logan W. R., and Silvert D. J.** 1982. The formation of the pupal cuticle by *Drosophila* imaginal discs in vitro. *Dev.Biol.* **91**: 337-350.
58. **Garen A., Kauvar L., and Lepesant J. A.** 1977. Roles of ecdysone in *Drosophila* development. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **11**: 5099-5103.
59. **Georget V., Lobaccaro J. M., Terouanne B., Mangeat P., Nicolas J. C., and Sultan C.** 1997. Trafficking of the androgen receptor in living cells with fused green fluorescent protein-androgen receptor. *Mol.Cell Endocrinol.* **129**: 17-26.
60. **Glass C. K., Lipkin S. M., Devary O. V., and Rosenfeld M. G.** 1989. Positive and negative regulation of gene transcription by a retinoic acid-thyroid hormone receptor heterodimer. *Cell* **59**: 697-708.
61. **Guay P. S. and Guild G. M.** 1991. The ecdysone-induced puffing cascade in *Drosophila* salivary glands: a Broad-Complex early gene regulates intermolt and late gene transcription. *Genetics* **129**: 169-175.
62. **Guiochon-Mantel A., Lescop P., Christin-Maitre S., Loosfelt H., Perrot-Applanat M., and Milgrom E.** 1991. Nucleocytoplasmic shuttling of the progesterone receptor. *EMBO J.* **10**: 3851-3859.

63. **Guiochon-Mantel A., Loosfelt H., Lescop P., Sar S., Atger M., Perrot-Applanat M., and Milgrom E.** 1989. Mechanisms of nuclear localization of the progesterone receptor: evidence for interaction between monomers. *Cell* **57**: 1147-1154.
64. **Handler A. M.** 1982. Ecdysteroid titers during pupal and adult development in *Drosophila melanogaster*. *Dev.Biol.* **93**: 73-82.
65. **Handler A. M. and Maroy P.** 1989. Ecdysteroid receptors in *Drosophila melanogaster* adult females. *Mol.Cell Endocrinol.* **63**: 103-109.
66. **Heinzel T., Lavinsky R. M., Mullen T. M., Soderstrom M., Laherty C. D., Torchia J., Yang W. M., Brard G., Ngo S. D., Davie J. R., Seto E., Eisenman R. N., Rose D. W., Glass C. K., and Rosenfeld M. G.** 1997. A complex containing N-CoR, mSin3 and histone deacetylase mediates transcriptional repression. *Nature* **387**: 43-48.
67. **Hock T., Cottrill T., Keegan J., and Garza D.** 2000. The E23 early gene of *Drosophila* encodes an ecdysone-inducible ATP-binding cassette transporter capable of repressing ecdysone-mediated gene activation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97**: 9519-9524.
68. **Holley S. J. and Yamamoto K. R.** 1995. A role for Hsp90 in retinoid receptor signal transduction. *Mol.Biol.Cell* **6**: 1833-1842.
69. **Horlein A. J., Naar A. M., Heinzel T., Torchia J., Gloss B., Kurokawa R., Ryan A., Kamei Y., Soderstrom M., Glass C. K., and .** 1995. Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* **377**: 397-404.
70. **Htun H., Holth L. T., Walker D., Davie J. R., and Hager G. L.** 1999. Direct visualization of the human estrogen receptor alpha reveals a role for ligand in the nuclear distribution of the receptor. *Mol.Biol.Cell* **10**: 471-486.
71. **Huang E. Y., Zhang J., Miska E. A., Guenther M. G., Kouzarides T., and Lazar M. A.** 2000. Nuclear receptor corepressors partner with class II histone deacetylases in a Sin3-independent repression pathway. *Genes Dev.* **14**: 45-54.
72. **Huet F., Ruiz C., and Richards G.** 1993. Puffs and PCR: the in vivo dynamics of early gene expression during ecdysone responses in *Drosophila*. *Development* **118**: 613-627.
73. **Huet F., Ruiz C., and Richards G.** 1995. Sequential gene activation by ecdysone in *Drosophila melanogaster*: the hierarchical equivalence of early and early late genes. *Development* **121**: 1195-1204.
74. **Ing N. H., Beekman J. M., Tsai S. Y., Tsai M. J., and O'Malley B. W.** 1992. Members of the steroid hormone receptor superfamily interact with TFIIB (S300-II). *J.Biol.Chem.* **267**: 17617-17623.
75. **Jiang C., Baehrecke E. H., and Thummel C. S.** 1997. Steroid regulated programmed cell death during *Drosophila* metamorphosis. *Development* **124**: 4673-4683.
76. **Kao H. Y., Downes M., Ordentlich P., and Evans R. M.** 2000. Isolation of a novel histone deacetylase reveals that class I and class II deacetylases promote SMRT-mediated repression. *Genes Dev.* **14**: 55-66.
77. **Karim F. D., Guild G. M., and Thummel C. S.** 1993. The *Drosophila* Broad-Complex plays a key role in controlling ecdysone-regulated gene expression at the onset of metamorphosis. *Development* **118**: 977-988.
78. **Karim F. D. and Thummel C. S.** 1992. Temporal coordination of regulatory gene expression by the steroid hormone ecdysone. *EMBO J.* **11**: 4083-4093.
79. **Kastner P., Mark M., and Chambon P.** 1995. Nonsteroid nuclear receptors: what are genetic studies telling us about their role in real life? *Cell* **83**: 859-869.

80. **KISS I., Beaton A. H., Tardiff J., Fristrom D., and Fristrom J. W.** 1988. Interactions and developmental effects of mutations in the Broad-Complex of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **118**: 247-259.
81. **KISS I., SZABAD J., and Major J.** 1978. Genetic and developmental analysis of puparium formation in *Drosophila*. *MOL GEN GENET* **1**: 77-83.
82. **Koelle M. R., Segraves W. A., and Hogness D. S.** 1992. DHR3: a *Drosophila* steroid receptor homolog. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **89**: 6167-6171.
83. **Koelle M. R., Talbot W. S., Segraves W. A., Bender M. T., Cherbas P., and Hogness D. S.** 1991. The *Drosophila* EcR gene encodes an ecdysone receptor, a new member of the steroid receptor superfamily. *Cell* **67**: 59-77.
84. **Kozlova T. and Thummel C. S.** 2000. Steroid regulation of postembryonic development and reproduction in *Drosophila*. *Trends Endocrinol.Metab* **11**: 276-280.
85. **Kraus W. L. and Kadonaga J. T.** 1998. p300 and estrogen receptor cooperatively activate transcription via differential enhancement of initiation and reinitiation. *Genes Dev.* **12**: 331-342.
86. **Lam G., Hall B. L., Bender M., and Thummel C. S.** 1999. DHR3 is required for the prepupal-pupal transition and differentiation of adult structures during *Drosophila* metamorphosis. *Dev Biol* **212**: 204-216.
87. **Lam G. and Thummel C. S.** 2000. Inducible expression of double-stranded RNA directs specific genetic interference in *Drosophila*. *Curr.Biol* **10**: 957-963.
88. **Lam G. T., Jiang C., and Thummel C. S.** 1997. Coordination of larval and prepupal gene expression by the DHR3 orphan receptor during *Drosophila* metamorphosis. *Development* **124**: 1757-1769.
89. **Lavorgna G., Karim F. D., Thummel C. S., and Wu C.** 1993. Potential role for a FTZ-F1 steroid receptor superfamily member in the control of *Drosophila* metamorphosis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **90**: 3004-3008.
90. **Lavorgna G., Ueda H., Clos J., and Wu C.** 1991. FTZ-F1, a steroid hormone receptor-like protein implicated in the activation of fushi tarazu. *Science* **252**: 848-851.
91. **Lee C. Y., Wendel D. P., Reid P., Lam G., Thummel C. S., and Baehrecke E. H.** 2000. E93 directs steroid-triggered programmed cell death in *Drosophila*. *Mol Cell* **6**: 433-443.
92. **Li T. and Bender M.** 2000. A conditional rescue system reveals essential functions for the ecdysone receptor (EcR) gene during molting and metamorphosis in *Drosophila*. *Development* **127**: 2897-2905.
93. **Lim C. S., Baumann C. T., Htun H., Xian W., Irie M., Smith C. L., and Hager G. L.** 1999. Differential localization and activity of the A- and B-forms of the human progesterone receptor using green fluorescent protein chimeras. *Mol.Endocrinol.* **13**: 366-375.
94. **Luisi B. F., Xu W. X., Otwinowski Z., Freedman L. P., Yamamoto K. R., and Sigler P. B.** 1991. Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. *Nature* **352**: 497-505.
95. **Mandaron P.** 1970. [In vitro development of imaginal disks of *Drosophila*. Morphological and histological aspects]. *Dev.Biol.* **22**: 298-320.
96. **Mangelsdorf D. J. and Evans R. M.** 1995a. The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* **83**: 841-850.

97. **Mangelsdorf D. J., Thummel C., Beato M., Herrlich P., Schutz G., Umesono K., Blumberg B., Kastner P., Mark M., Chambon P., and .** 1995b. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* **83**: 835-839.
98. **Maniatis, T., Sambrook, J., and Fritsch, E. F.** *Molecular Cloning : A Laboratory Manual* , Cold Spring Harbor Laboratory.
99. **Maroy P, Kaufmann G., and Dubendorfer A.** 1988. Embryonic ecdysteroids of *Drosophila-melanogaster*. *INSECT PHYSIOL* **7**: 633-637.
100. **Maroy P., Dennis R., Beckers C., Sage B. A., and O'Connor J. D.** 1978. Demonstration of an ecdysteroid receptor in a cultured cell line of *Drosophila melanogaster*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **75**: 6035-6038.
101. **McGinnis W., Shermoen A. W., and Beckendorf S. K.** 1983. A transposable element inserted just 5' to a *Drosophila* glue protein gene alters gene expression and chromatin structure. *Cell* **34**: 75-84.
102. **Meyerowitz E. M. and Hogness D. S.** 1982. Molecular organization of a *Drosophila* puff site that responds to ecdysone. *Cell* **28**: 165-176.
103. **Miller W. L.** 1988. Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocr.Rev.* **9**: 295-318.
104. **Mougnau E., von Seggern D., Fowler T., Rosenblatt J., Jongens T., Rogers B., Gietzen D., and Beckendorf S. K.** 1993. A transcriptional switch between the *Pig-1* and *Sgs-4* genes of *Drosophila melanogaster*. *Mol.Cell Biol.* **13**: 184-195.
105. **Mouillet J. F., Henrich V. C., Lezzi M., and Vogtli M.** 2001. Differential control of gene activity by isoforms A, B1 and B2 of the *Drosophila* ecdysone receptor. *Eur.J.Biochem.* **268**: 1811-1819.
106. **Muscat G. E., Burke L. J., and Downes M.** 1998. The corepressor N-CoR and its variants RIP13a and RIP13Delta1 directly interact with the basal transcription factors TFIIB, TAFII32 and TAFII70. *Nucleic Acids Res.* **26**: 2899-2907.
107. **Naar A. M., Beurang P. A., Robinson K. M., Oliner J. D., Avizonis D., Scheek S., Zwicker J., Kadonaga J. T., and Tjian R.** 1998. Chromatin, TAFs, and a novel multiprotein coactivator are required for synergistic activation by Sp1 and SREBP-1a in vitro. *Genes Dev.* **12**: 3020-3031.
108. **Nagy L., Kao H. Y., Chakravarti D., Lin R. J., Hassig C. A., Ayer D. E., Schreiber S. L., and Evans R. M.** 1997. Nuclear receptor repression mediated by a complex containing SMRT, mSin3A, and histone deacetylase. *Cell* **89**: 373-380.
109. **Ohno C. K. and Petkovich M.** 1993. FTZ-F1 beta, a novel member of the *Drosophila* nuclear receptor family. *Mech.Dev.* **40**: 13-24.
110. **Oro A. E., McKeown M., and Evans R. M.** 1992. The *Drosophila* retinoid X receptor homolog ultraspiracle functions in both female reproduction and eye morphogenesis. *Development* **115**: 449-462.
111. **Perrimon N., Engstrom L., and Mahowald A. P.** 1985. Developmental genetics of the 2C-D region of the *Drosophila* X chromosome. *Genetics* **111**: 23-41.
112. **Postlethwait JH. and Shirk PD.** 1981. Genetic and endocrine regulation of vitellogenesis in *Drosophila*. *AM ZOOL* **3**: 687-700.
113. **Pratt W. B.** 1993. The role of heat shock proteins in regulating the function, folding, and trafficking of the glucocorticoid receptor. *J.Biol.Chem.* **268**: 21455-21458.
114. **Rastinejad F., Perlmann T., Evans R. M., and Sigler P. B.** 1995. Structural determinants of nuclear receptor assembly on DNA direct repeats. *Nature* **375**: 203-211.

115. **Renaud J. P., Rochel N., Ruff M., Vivat V., Chambon P., Gronemeyer H., and Moras D.** 1995. Crystal structure of the RAR-gamma ligand-binding domain bound to all-trans retinoic acid. *Nature* **378**: 681-689.
116. **Richards G.** 1976a. Sequential gene activation by ecdysone in polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster*. IV. The mid prepupal period. *Dev.Biol.* **54**: 256-263.
117. **Richards G.** 1976b. Sequential gene activation by ecdysone in polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster*. V. The late prepupal puffs. *Dev.Biol.* **54**: 264-275.
118. **Robertson C. W.** 1936. The metamorphosis of *Drosophila melanogaster*, including an accurately timed account of principal morphological changes. *J.Morphol.* **59**: 351-399.
119. **Robinow S., Talbot W. S., Hogness D. S., and Truman J. W.** 1993. Programmed cell death in the *Drosophila* CNS is ecdysone-regulated and coupled with a specific ecdysone receptor isoform. *Development* **119**: 1251-1259.
120. **Rorth P.** 1996. A modular misexpression screen in *Drosophila* detecting tissue-specific phenotypes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **93**: 12418-12422.
121. **Rubenstein E. C., Kelly T. J., and Schwartz M. B.** 1982. In vitro synthesis and secretion of ecdysteroids by *Drosophila melanogaster* ovaries. *J EXP ZOOLOG* **3**: 305-308.
122. **Schubiger M., Wade A. A., Carney G. E., Truman J. W., and Bender M.** 1998. *Drosophila* EcR-B ecdysone receptor isoforms are required for larval molting and for neuron remodeling during metamorphosis. *Development* **125**: 2053-2062.
123. **Schulman I. G., Chakravarti D., Juguilon H., Romo A., and Evans R. M.** 1995. Interactions between the retinoid X receptor and a conserved region of the TATA-binding protein mediate hormone-dependent transactivation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **92**: 8288-8292.
124. **Schwabe J. W., Chapman L., Finch J. T., and Rhodes D.** 1993. The crystal structure of the estrogen receptor DNA-binding domain bound to DNA: how receptors discriminate between their response elements. *Cell* **75**: 567-578.
125. **Segraves W. A. and Hogness D. S.** 1990. The E75 ecdysone-inducible gene responsible for the 75B early puff in *Drosophila* encodes two new members of the steroid receptor superfamily. *Genes Dev.* **4**: 204-219.
126. **Shiau A. K., Barstad D., Loria P. M., Cheng L., Kushner P. J., Agard D. A., and Greene G. L.** 1998. The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen. *Cell* **95**: 927-937.
127. **Sinka R., Jankovics F., Somogyi K., Szlanka T., Lukacsovich T., and Erdelyi M.** 2002. *poirot*, a new regulatory gene of *Drosophila* *oskar* acts at the level of the short *Oskar* protein isoform. *Development* **129**: 3469-3478.
128. **Spradling A. C., Stern D. M., KISS I., Roote J., Laverly T., and Rubin G. M.** 1995. Gene disruptions using P transposable elements: an integral component of the *Drosophila* genome project. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **92**: 10824-10830.
129. **Stone B. L. and Thummel C. S.** 1993. The *Drosophila* 78C early late puff contains E78, an ecdysone-inducible gene that encodes a novel member of the nuclear hormone receptor superfamily. *Cell* **75**: 307-320.
130. **Stowers R. S., Garza D., Rasche A., and Hogness D. S.** 2000. The L63 gene is necessary for the ecdysone-induced 63E late puff and encodes CDK proteins required for *Drosophila* development. *Dev.Biol.* **221**: 23-40.

131. **Stowers R. S., Russell S., and Garza D.** 1999. The 82F late puff contains the L82 gene, an essential member of a novel gene family. *Dev.Biol.* **213**: 116-130.
132. **Talbot W. S., Swyryd E. A., and Hogness D. S.** 1993. Drosophila tissues with different metamorphic responses to ecdysone express different ecdysone receptor isoforms. *Cell* **73**: 1323-1337.
133. **Tanenbaum D. M., Wang Y., Williams S. P., and Sigler P. B.** 1998. Crystallographic comparison of the estrogen and progesterone receptor's ligand binding domains. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **95**: 5998-6003.
134. **Thomas H. E., Stunnenberg H. G., and Stewart A. F.** 1993. Heterodimerization of the Drosophila ecdysone receptor with retinoid X receptor and ultraspiracle. *Nature* **362**: 471-475.
135. **Thummel C. S.** 1995. From embryogenesis to metamorphosis: the regulation and function of Drosophila nuclear receptor superfamily members. *Cell* **83**: 871-877.
136. **Thummel C. S., Burtis K. C., and Hogness D. S.** 1990. Spatial and temporal patterns of E74 transcription during Drosophila development. *Cell* **61**: 101-111.
137. **Tone Y., Collingwood T. N., Adams M., and Chatterjee V. K.** 1994. Functional analysis of a transactivation domain in the thyroid hormone beta receptor. *J.Biol.Chem.* **269**: 31157-31161.
138. **Torok T., Tick G., Alvarado M., and KISS I.** 1993. P-lacW insertional mutagenesis on the second chromosome of Drosophila melanogaster: isolation of lethals with different overgrowth phenotypes. *Genetics* **135**: 71-80.
139. **Tsai C. C., Kao H. Y., Yao T. P., McKeown M., and Evans R. M.** 1999. SMRTER, a Drosophila nuclear receptor coregulator, reveals that EcR-mediated repression is critical for development. *Mol.Cell* **4**: 175-186.
140. **Umesono K. and Evans R. M.** 1989. Determinants of target gene specificity for steroid/thyroid hormone receptors. *Cell* **57**: 1139-1146.
141. **Vaskova M., Bentley A. M., Marshall S., Reid P., Thummel C. S., and Andres A. J.** 2000. Genetic analysis of the Drosophila 63F early puff. Characterization of mutations in E63-1 and maggie, a putative Tom22. *Genetics* **156**: 229-244.
142. **Wagner R. L., Apriletti J. W., McGrath M. E., West B. L., Baxter J. D., and Fletterick R. J.** 1995. A structural role for hormone in the thyroid hormone receptor. *Nature* **378**: 690-697.
143. **Walker V. K., Watson K. L., and Holden J. J. A.** 1987. Vitellogenesis and fertility in Drosophila females with low ecdysone titers. The L(3) DTS-3 mutation. *J INSECT PHYSIOL* **3**: 137-142.
144. **Wen Y. D., Perissi V., Staszewski L. M., Yang W. M., Kronen A., Glass C. K., Rosenfeld M. G., and Seto E.** 2000. The histone deacetylase-3 complex contains nuclear receptor corepressors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97**: 7202-7207.
145. **White K. P., Hurban P., Watanabe T., and Hogness D. S.** 1997. Coordination of Drosophila metamorphosis by two ecdysone-induced nuclear receptors. *Science* **276**: 114-117.
146. **Williams S. P. and Sigler P. B.** 1998. Atomic structure of progesterone complexed with its receptor. *Nature* **393**: 392-396.
147. **Wong C. W. and Privalsky M. L.** 1998a. Transcriptional repression by the SMRT-mSin3 corepressor: multiple interactions, multiple mechanisms, and a potential role for TFIIB. *Mol.Cell Biol.* **18**: 5500-5510.

148. **Wong J., Patterton D., Imhof A., Guschin D., Shi Y. B., and Wolffe A. P.** 1998b. Distinct requirements for chromatin assembly in transcriptional repression by thyroid hormone receptor and histone deacetylase. *EMBO J.* **17**: 520-534.
149. **Woodard C. T., Baehrecke E. H., and Thummel C. S.** 1994. A molecular mechanism for the stage specificity of the *Drosophila* prepupal genetic response to ecdysone. *Cell* **79**: 607-615.
150. **Wright L. G., Chen T., Thummel C. S., and Guild G. M.** 1996. Molecular characterization of the 71E late puff in *Drosophila melanogaster* reveals a family of novel genes. *J.Mol.Biol.* **255**: 387-400.
151. **Xu L., Glass C. K., and Rosenfeld M. G.** 1999. Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function. *Curr.Opin.Genet.Dev.* **9**: 140-147.
152. **Yao T. P., Forman B. M., Jiang Z., Cherbas L., Chen J. D., McKeown M., Cherbas P., and Evans R. M.** 1993. Functional ecdysone receptor is the product of EcR and Ultraspiracle genes. *Nature* **366**: 476-479.
153. **Yao T. P., Segraves W. A., Oro A. E., McKeown M., and Evans R. M.** 1992. *Drosophila* ultraspiracle modulates ecdysone receptor function via heterodimer formation. *Cell* **71**: 63-72.
154. **Zhang J., Guenther M. G., Carthew R. W., and Lazar M. A.** 1998. Proteasomal regulation of nuclear receptor corepressor-mediated repression. *Genes Dev.* **12**: 1775-1780.
155. **Zhu X. G., Hanover J. A., Hager G. L., and Cheng S. Y.** 1998. Hormone-induced translocation of thyroid hormone receptors in living cells visualized using a receptor green fluorescent protein chimera. *J.Biol.Chem.* **273**: 27058-27063.

ÖSSZEFOGLALÁS

A rovarok egyedfejlődésének kulcsfontosságú szabályozója az ecdizon (vedlési hormon). Régóta ismert, hogy az egyedfejlődés során bizonyos fejlődési állapotokban rövid ideig tartó ecdizon csúcsok (hormon koncentráció maximumok) jelennek meg, és ezek hatására következnek be az adott állapotra jellemző hormon függő fejlődési lépések. Az ecdizon jelet az ecdizon receptor közvetíti a sejtek számára, mely maga egy, a hormon megkötése révén aktiválódó transzkripciós faktor. Mai ismereteink szerint az ecdizon válasz a különböző fejlődési állapotokban és célszövetekben hasonló mechanizmus szerint játszódik le. Az ecdizon koncentráció növekedésére egy génindukciós kaszkád lép működésbe, melynek végeredményeként aktiválódnak azok az effektor gének, melyek kialakítják a sejtek ecdizonra adott specifikus válaszát.

A *Drosophila* ecdizon receptor két nukleáris receptor fehérjéből, az *ultraspracle* (*usp*), és az *ecdizon receptor* (*EcR*) gén termékéből felépülő heterodimer (Koelle és mtsai, 1991; Yao és mtsai, 1992; Thomas és mtsai, 1993).

Működőképes ecdizon receptor nincs állandóan jelen a célsejtekben, mivel az *EcR* gén maga is az ecdizonnal indukálható gének közé tartozik (Deák P és mtsai, 1988; Karim és mtsai, 1992). Következésképpen a szövetek csak a magas ecdizon koncentrációjú állapotokban válnak hormon érzékennyé.

Az *Drosophila EcR* gén bonyolult felépítésű. Két elkülönült transzkripciós kezdő pontról alternatív mRNS érés eredményeképpen három izoforma (*EcRA*, *EcRB1*, *EcRB2*) képződését mutatták ki (Talbot és mtsai, 1993). Sok éves intenzív kutatás ellenére sem ismert pontosan, az egyes *EcR* izoformák szerepe. Léteznek kísérleti bizonyítékok arra, hogy az egyes izoformák egymást helyettesíteni tudják, ha transzgén segítségével minden sejtben nagy mennyiségben fejeztetik ki őket (Li és mtsai, 2000; Bender és mtsai, 1997). Nem világos azonban, hogy ez a helyettesítés hol és milyen mértékben megy végbe a normális működés során. Az irodalomban az egyes izoformák specifikus szerepére utaló eredmények is találhatóak (Talbot és mtsai, 1993; Mouillet és mtsai, 2001). Izoforma specifikus mutáns allélek csak az *EcRB1* izoformára léteznek (Bender és mtsai, 1997). Ezekon kívül a két *EcRB* izoformát egyszerre inaktíváló (Schubiger és mtsai, 1998), illetve az összes *EcR* izoformát inaktíváló (Bender és mtsai, 1997) allélek ismertek. Izoforma specifikus allélek hiányában tehát az *EcRA* és az *EcRB2* izoformák funkciója közvetlenül nem vizsgálható.

Értekezésem alapjául szolgáló kísérleteinkben az *EcR* izoformák szerepének jobb megértéséhez kívántunk hozzájárulni további *EcR* izoformák illetve mutáns allélek azonosításával és jellemzésével.

A Berkeley Drosophila Genome Project (BDGP) által létrehozott EST gyűjtemény szűrésével azonosítottunk egy eddig ismeretlen *EcR* izoformát (*EcRC*). Az *EcRC* a többi ismert *EcR* izoformától elkülönülő transzkripciós kezdőponttal rendelkezik, azonban terméke megegyezik az *EcRA* izoforma által kódolt fehérjével (*EcRA*).

Az *EcRA* és az *EcRC* izoformák elkülönült transzkripciós kezdőpontja az *EcRA* fehérje képződésének összetett szabályozására hívja fel a figyelmet. Ma még nem tisztázott, hogy mi a szerepe annak, hogy az *EcRA* fehérje két függetlenül szabályozott izoformáról is képződhet. Lehetséges, hogy az *EcRA* fehérje nagy mennyiségben történő termelődése valósul meg ily módon. Elképzelhető azonban az is, hogy az *EcRA* fehérjét kódoló izoformák időben és térben történő finoman szabályozott kifejeződésének van fontos, máig feltáratlan funkciója.

Az *EcRC* izoforma kimutatásával felmerült a kérdés, vajon az újonnan megismert izoforma kifejeződési mintázata eltérő-e a korábban azonosított *EcR* izoformákétól, illetve az átíródása korlátozódik-e bizonyos fejlődési állapotokra. Az RT-PCR módszerrel lehetőségünk volt külön-külön megvizsgálni az egyes *EcR* izoformák (*EcRA*, *EcRB1*, *EcRB2*, *EcRC*) kifejeződését *Drosophila* egyedfejlődése során. A két *EcRB* izoforma kifejeződése azonos mintázat szerint alakul, amit az azonos transzkripciós kezdőpontjuk indokol is. Az *EcRC* az *EcRA* izoformához hasonló mintázat szerint fejeződik ki. Mindkét izoformának megfelelő mRNS kimutatható minden vizsgált fejlődési állapotban. Az *EcRA* és az *EcRC* mRNS szintek változásai az egyes fejlődési állapotokban jóval kisebb mértékűek, mint az *EcRB* izoformák esetében. Az *EcRA* és az *EcRC* izoformák kifejeződésében két fejlődési állapotban fedezhető fel különbség. A korai embriókban és a kifejlett nőstények petefészkében az *EcRC* mRNS van jelen nagyobb mennyiségben.

Letális P-inszerciós gyűjteményben (Török és mtsai, 1993) kilenc *EcR* allélt azonosítottunk. Meghatároztuk a P-inszerciók helyzetét, az allélek letális fázisát és az elpusztuló állatok fenotípusát. Megállapítottuk, hogy a *P+12319* allél az összes *EcR* izoformát inaktíválja, a *P-9* allél az *EcRB* izoformák csökkent kifejeződését okozza, nem befolyásolja azonban az *EcRA* és az *EcRC* izoformák működését, a fennmaradó hét allél (*P-25*, *P-40*, *P-191²⁷*, *P-191⁷⁷*, *P-191¹⁰¹*, *P-1391*, *P-5738*) pedig gyakorlatilag amorf allélnak tekinthető az *EcRA* és az *EcRC* izoformákra nézve, és emellett hipomorf allélként viselkedik az *EcRB* izoformák tekintetében. Az embrió letális *P+12319* allél kivételével minden letális

P-inszerciós mutánsban normálisan lejátszódik az embrionális és a lárvális fejlődés. Az EcRA fehérje jelenléte tehát nem esszenciális ebben a két fejlődési állapotban.

Ismert helyzetű P-inszerciók között azonosítottunk két olyan P-inszerciós *EcR* allélt (*l(2)06410*, *EP(2)2509*) melyekben a P-elem az *EcRA* és az *EcRC* izoformák intronjában található. Megállapítottuk, hogy mindkét mutánsban gártolt az *EcRA* és az *EcRC* izoformák kifejeződése. Az *l(2)06410* allél gyakorlatilag amorf, az *EP(2)2509* amorfhoz közeli hipomorf allélnak tekinthető az EcRA fehérjét kódoló két izoformára nézve.

A *l(2)06410* inszerciót a *long island expressway (lie)* gén hímsterilitást és csökkent életképességet okozó alléljaként azonosították (Castrillon és mtsai, 1993). Az inszerció helyét eltávolító deléciókkal végzett komplementációs analízissel kiderítettük, hogy a hímsteril személetális fenotípus független az *EcR* régióban található P-inszerciótól.

A *l(2)06410* és az *EP(2)2509* allélek fenotípus vizsgálata azt mutatta, hogy az EcRA fehérje hiányában tökéletesen kifejlődött adult legyek jönnek létre, tehát az EcRA fehérje jelenléte nem létfontosságú az egyedfejlődés egyik fázisában sem. Az EcRA fehérje hiánya a hím állatok fertilitását sem befolyásolta.

A *l(2)06410* és az *EP(2)2509* allélek *EcR^{554fs}* alléllal (az összes *EcR* izoformát inaktíváló amorf allél) szemben heterozigóta (*l(2)06410/EcR^{554fs}* és az *EP(2)2509/EcR^{554fs}*) nőstényeiben kis mértékű rendellenesség kimutatható volt a peteérésben. Mivel a *l(2)06410/EP(2)2509* genotípusú egyedek nem mutatták ezt a fenotípust, úgy gondoljuk, hogy az említett rendellenesség nem egyedül az EcRA fehérje hiányából adódik, hanem az EcRA fehérje teljes hiányának és az EcRB fehérjék csökkent mennyiségének együttes következményeként alakul ki.

Érdekes, hogy az EcRA fehérje jelen van minden fejlődési állapotban, illetve, hogy EcRA fehérje két egymástól függetlenül szabályozott *EcR* izoformáról is képződhet, hiányában mégsem tapasztalható a vad típustól eltérő fenotípus a laboratóriumi körülmények között nevelt állatokban. Felmerül a kérdés, hogy az EcRA fehérje szerepe abban merül-e ki, hogy hozzájárul egy szükségesnél magasabb, túlbiztosított állapotnak látszó, ekdizon receptor szint kialakításához, vagy ezenkívül specifikus funkciója is van. Lehetséges pl., hogy az EcRA fehérje hiánya az állatok viselkedésében okoz változást, ami a természetben élő egyedek életét drasztikusan befolyásolhatja, de a laboratóriumban szokásos tenyésztési körülmények között esetleg nem eredményez detektálható eltérést a vad fenotípustól. Az állatok viselkedése elsősorban az idegrendszer működésével hozható kapcsolatba.

Elképzelhető tehát, hogy az EcRA fehérje specifikus funkcióját az idegrendszer fejlődésében vagy működésében kell keresnünk.

Összehasonlítva az általunk azonosított és a korábbról ismert *EcR* allélek fenotípusát, az *EcR* izoformák egymást helyettesítő szerepét tudtuk megerősíteni.

Az embrionális fejlődésre vonatkozóan elmondható, hogy csak az összes izoformát inaktiváló allélek (Bender és mtsai, 1997) okoznak embrió letalitást. Az EcRA fehérje hiányában (*I(2)06410* és *EP(2)2509* allélek) és a két EcRB fehérje együttes hiányában (Schubiger és mtsai, 1998) is normális az embrionális fejlődés, tehát önmagában egyik izoforma sem nélkülözhetetlen a fejlődésnek ebben a szakaszában. Az embrió állapotban a különböző EcR izoformák képesek egymást helyettesítve ellátni a normális fejlődéshez szükséges ekdizon receptor funkciót.

A lárva állapotban az EcRA fehérje hiánya (*I(2)06410* és *EP(2)2509* allélek) nem okoz fejlődési zavart, és azokban a mutánsokban is zavartalan a lárvális fejlődés melyek nem tartalmazzák EcRA fehérjét, a két EcRB fehérje termelése pedig csökkent mértékű (*P-25*, *P-40*, *P-191²⁷*, *P-191⁷⁷*, *P-191¹⁰¹*, *P-1391*, *P-5738*). Minden izoforma együttes kiesése esetén a lárvák fejlődése 100%-ban elakad az adott lárva stádium végén (Li és mtsai, 2000). A két *EcRB* izoformát egyszerre eltávolító allélek mutánsai szintén a lárvális vedlések során, zömmel az első lárva stádium végén pusztúlnak el, az állatok egy kis része azonban képes a vedlésre és eléri a második, illetve a harmadik lárva stádiumot is (Schubiger és mtsai, 1998). Abban az esetben, ha csak az EcRB1 izoforma hiányzik a mutáns egyedek döntő többsége eléri a második lárva stádiumot, sőt 40-60 %-uk a harmadik lárva stádiumba is eljut (Bender és mtsai, 1997). A bemutatott fenotípusok arra utalnak, hogy a lárvális fejlődés során sincs elkülönült szerepe az egyes *EcR* izoformáknak. Minden izoforma részt vesz a lárvális vedlések szabályozásában. (A redundáns funkciójú EcRA fehérje részvétele is kimutatható, hiszen a két *EcRB* izoformát inaktiváló mutáció gyengébb fenotípust eredményez, mint az összes izoforma hiánya). A két *EcRB* izoforma együtt képes a tökéletes működéshez elegendő ekdizon receptor fehérjét biztosítani, míg az *EcRA*, *EcRC*, vagy az *EcRA*, *EcRC* és *EcRB2* kombinációk nem képesek erre.

Az EcRA fehérjére a metamorfózis normális lejátszódásához sincs szükség (*I(2)06410* és *EP(2)2509* allélek). A többi ismert *EcR* allél mutáns egyedeinek fejlődése azonban elakad a metamorfózis során. A különböző allélek fenotípusa abban tér el, hogy a mutáns lárvák szöveteiben elinduló, a metamorfózis kezdetére jellemző változások a fejlődés mely szintjén rekednek meg. A mutáns fenotípusok nem támasztják alá azt az elméletet, miszerint az egyes *EcR* izoformák önálló elkülönült funkcióval rendelkeznek, és a különböző szövetek sorsát a

metamorfózisban az szabja meg, hogy melyik *EcR* izoforma fejeződik ki bennük dominánsan (Talbot és mtsai, 1993). Az imágó korongok (*EcRA* fehérjét tartalmaznak nagy mennyiségben) és a középbél (*EcRB1* fehérje termelődik bennük dominánsan) fejlődését vizsgálva azokban a P-inszerciós mutánsokban, melyek egyikében sem termelődik *EcRA* fehérje, a két *EcRB* izoforma működése pedig alléltól függően különböző mértékben gátolt, az figyelhető meg, hogy mindkét szövet fejlődése korábban reked meg az erősebb allélek esetében (*P-25*, *P-40*), mint a gyengébb allélek mutánsaiban (*P-191*²⁷, *P-1391*, *P-5738*). Másik meggyőző példa, hogy az *EcRA* fehérje hiányában (*I(2)06410* és *EP(2)2509* allélek) az imágó korongokból tökéletesen kifejlődött adult képletek képződnek.

A letális P-inszerciós *EcR* mutánsokon végzett menekítési kísérletek, melyekben a különböző *EcR* izoformákat (*EcRA*, *EcRB1* és *EcRB2*) hősokk promóter által szabályozott transzgénekként fejeztettük ki, szintén azt mutatják, hogy az egyes *EcR* izoformák egymást helyettesíteni tudják, mivel az egyes izoformák külön-külön kifejeztetve is képesek voltak menekíteni a mutánsok letális fenotípusát. Az egyes allélek menekíthetősége, a *P-9* kivételével, attól függött, hogy az illető allél milyen mértékben gátolja az *EcRB* fehérjék termelődését. A kísérletek során a leggyengébb (*P-5738*) allél menekült leghatékonyabban. A legerősebb fenotípust mutató allélek (*P-25* és *P-40*) letális fenotípusát nem menekítette, ha a harmadik lárva stádium végén egyetlen hősokkal indukáltuk az *EcR* transzgénnek átíródását, azonban a bábozódás után néhány órával újabb hősokkot alkalmazva ezen allélek mutáns egyedei is elérték a kifejlett állapotot. A *P-9* allél, mely a *P-25* és *P-40* allélekhez hasonlóan az *EcRB* izoformák transzkripció start pontja közvetlen közelében hordozza a P-inszerciót, és ebből adódóan az *EcRB* izoformák működését minden bizonnyal ugyanolyan mértékben gátolja, ezekben a kísérletekben is kivételesen viselkedett, egyetlen hősokk alkalmazásával is menekíthető volt, igaz alacsonyabb szinten, mint a távolabbi inszerciókat hordozó gyengébb allélek. Ez az eredmény is alátámasztja, hogy az *EcRA* fehérje redundáns szerepe ellenére részt vesz a metamorfózis időszakában lejátszódó folyamatokban.

Az általunk azonosított nagy számú P-inszerciós allél molekuláris jellemzése során egy, az *EcR* gén működésén túlmutató, általános érvényű jelenségre találtunk példát az intronba ékelődött mesterséges transzpozon inszerciók génműködés gátló hatásával kapcsolatban. Az inszerciók által hordozott szelekciót biztosító marker gén az érintett génnel azonos orientációban megzavarja a normális mRNS érést. Abnormális intron kivágódás következtében a transzpozon által érintett gén, és a szelekciós marker gén exonjainak fúziójával egy kiméra mRNS képződik.

SUMMARY

The molting hormone ecdysone is a key regulator of insect development. Pulses of ecdysone appearing in certain developmental stages direct the ecdysone-dependent developmental steps. The ecdysone manifests its effects via interaction with the ecdysone receptor, which is a transcription factor, activated by hormone-binding. To our knowledge, ecdysone acts by the same mechanism in different developmental stages and target tissues. Increase of ecdysone concentration induces a gene cascade. A small number of primary-response early genes encode transcription factors that coordinate the induction of a large set of secondary-response, so called late genes, which mediate stage- and tissue-specific biological responses. In *Drosophila* the ecdysone receptor is a heterodimer of two nuclear receptor proteins, EcR and USP encoded by the genes *EcR* (*ecdysone receptor*) and *usp* (*ultraspiracle*) respectively (Koelle et al., 1991; Yao et al., 1992; Thomas et al., 1993). Since the *EcR* gene is itself ecdysone-induced (Deák P et al., 1988; Karim et al., 1992), the hormone-sensitivity of target tissues occur only in specific developmental stages marked by high ecdysone concentrations.

The structure of the *Drosophila EcR* gene is complex. It contains two separated transcription start sites and codes for three protein isoforms (EcRA, EcRB1, EcRB2) produced by alternative splicing (Talbot et al, 1993). The exact role of different EcR isoforms is unknown. Any EcR isoform can compensate the failure of another one if large amount of it is expressed ectopically (Li et al, 2000; Bender et al., 1997), however it is not clear to what extent this replacement works under normal conditions. On the other hand, there are data for the specific function of particular *EcR* isoforms, as well (Talbot et al, 1993; Mouillet et al, 2001). Mutant alleles which inactivate only the *EcRB1* isoform, or the *EcRB1* and *EcRB2*, or all three *EcR* isoforms together are described in the literature (Bender et al, 1997; Schubiger et al, 1998). However, the lack of mutations affecting only *EcRA* or the *EcRB2* isoform does not allow the direct functional study of these two *EcR* isoforms.

Therefore our goal was to shed light on the role of the *EcR* isoforms by identification and characterisation of further *EcR* mutant alleles, and determine if any additional, so far unidentified isoform(s) exists.

As a first step, we screened the collection of Berkeley *Drosophila* Genome Project (BDGP) EST sequences and identified a new *EcR* isoform, *EcRC*. The transcription start site of *EcRC* differs from that of any other *EcR* isoforms, but it encodes a protein identical with

EcRA. The different transcription start sites of *EcRA* and *EcRC* isoforms suggest that mRNAs giving rise to EcRA protein can be produced from different promoters. The exact role of this complex regulation of EcRA production is not clear, yet. It is possible, that the large amount of EcRA protein required at certain developmental stages could be produced on this way. Alternatively, it is also possible that the fine temporal and spatial tuning of EcRA expression plays an important role and this requires two isoforms with altering regulation.

We studied the expression of the *EcR* isoforms by RT-PCR during *Drosophila* development. We found the expression pattern of the *EcRB1* and the *EcRB2* isoforms identical, as expected by their common transcription start site. The *EcRC* and the *EcRA* isoforms showed similar expression pattern. *EcRC* and *EcRA* mRNAs could also be detected in all developmental stages studied. We observed differences in the expression pattern of the *EcRA* and *EcRC*. Namely, in the early embryos and in adult ovaries the *EcRC* mRNA was more abundant.

In order to identify further *EcR* alleles we screened a recessive lethal P-insertional mutant collection (Török et al., 1993) and found nine independent *EcR* mutant lines. We determined the positions of the P-insertions and the lethal phenotype of the alleles. Furthermore we analysed which *EcR* isoforms was affected in the mutants. The *P+12319* allele inactivates all *EcR* isoforms. The *P-9* results in a reduced expression of *EcRB* isoforms while it does not change the *EcRA* and *EcRC*. The remaining seven lesions (*P-25*, *P-40*, *P-191²⁷*, *P-191⁷⁷*, *P-191¹⁰¹*, *P-1391*, *P-5738*) are amorph alleles of *EcRA* and *EcRC* and hypomorph alleles of *EcRB* isoforms. The *P+12319* allele is embryonic lethal, whereas all of the other lethal P-insertional mutants execute normal embryonic and larval development. Thus, we can conclude that EcRA protein is not essential in these developmental stages.

In order to identify mutations which make possible direct study of the role of *EcRA* and *EcRC* isoforms, from databases we chose two P-insertional mutant lines (*l(2)06410* and *EP(2)2509*) which are known to have insertion positions in introns of *EcRA* and *EcRC*. Further analysis of these mutants revealed inhibition of EcRA protein synthesis. The *l(2)06410* is amorph and the *EP(2)2509* is strong hypomorph allele of both *EcRA* and *EcRC* isoforms. The *l(2)06410* insertion was originally isolated as a male-sterile, semilethal allele of the long island expressway (*lie*) gene (Castrillon et al., 1993). Complementation tests, using deficiencies which remove the region around the position of insertion, showed that the male-sterile, semilethal phenotype is independent from the *l(2)06410* insertion.

The *l(2)06410* and *EP(2)2509* mutations does not influence viability and morphology of the flies. Consequently, the EcRA protein is not essential at any stage of the *Drosophila*

development. The lack of EcRA protein did not cause any defect in the male fertility, but the oogenesis of *l(2)06410/EcR^{554fs}* and *EP(2)2509/EcR^{554fs}* females is slightly affected. This phenotype might be due to lack of EcRA and simultaneously reduced level of EcRB proteins, since the amorph *EcR^{554fs}* allele inactivates all *EcR* isoforms, and the *l(2)06410/EP(2)2509* heterozygotes do not show any abnormality in oogenesis.

Although EcRA is present in all developmental stages, and is produced by two independently regulated transcription units, its lack does not result in a distinguishable phenotype. From the observation that EcRA is not essential but its effect is seen if the other EcR isoforms are deleted, one might speculate whether EcRA serves as a back up to ensure EcR function or it has specific role which is important for the free-living flies but can not be studied under laboratory conditions.

Phenotypical comparison of *EcR* alleles described by us and others indicated that the different EcR isoforms could mutually replace each other.

The null mutants eliminating all isoforms are embryonic lethal (Bender et al., 1997), however either EcRA alone (Schubiger et al., 1998) or the two EcRB proteins (*l(2)06410*, *EP(2)2509*) are sufficient for normal embryonic development. These observations demonstrate the overlapping and redundant function of the EcR isoforms in the embryonic stage.

The *EcRA* null mutant larvae execute normal development (*l(2)06410*, *EP(2)2509*), even in combination with reduced levels of EcRB proteins (*P-25*, *P-40*, *P-191²⁷*, *P-1391*, *P-5738*). Complete arrest of larval development occurs in null mutants which inactivate all *EcR* isoforms (Li et al., 2000), whereas the lack of both *EcRB* isoforms causes a weaker phenotype, allowing development some of the mutant animals (Schubiger et al., 1998). The failure of EcRB1 has a moderate effect, 40-60% of the mutant larvae can molt and survive until L3 stage (Bender et al., 1997). These phenotypes show that the different *EcR* isoforms have not specific role in larval development. On the other hand, all isoforms participate in the regulation of larval moltings. The observation, that null alleles which eliminate all *EcR* isoforms have stronger phenotype than the EcRB1-B2 double mutants, demonstrates that the redundant EcRA protein participates in the larval development as well. EcRB1 and EcRB2 proteins together are sufficient for proper development, whereas EcRA or EcRA-EcRB2 combinations are not.

EcRA is not needed for metamorphosis (*l(2)06410*, *EP(2)2509*), but the mutants of the other known *EcR* alleles are arrested during metamorphosis. The phenotypes of mutants do not support the theory that the different EcR proteins have specific function, and that the fate of tissues during metamorphosis are determined by the predominant EcR isoform

expressed in the given tissue (Talbot et al, 1993). A further argument for this is that the development of imaginal discs which contain a large amount of EcRA, and the development of midgut which contains dominantly EcRB1, are arrested similarly, earlier in those mutants which are *EcRA-C* null and strong *EcRB* hypomorph (*P-25*, *P-40*) and later in those which are *EcRA-C* null and weak *EcRB* hypomorph (*P-191*²⁷, *P-1391*, *P-5738*). Furthermore, perfect adult body parts develop from imaginal discs in the lack of EcRA (*l(2)06410*, *EP(2)2509*).

A further arguments for the observation that the *EcR* isoforms can replace each other in the metamorphosis is that the lethal phenotype of the *EcRA-C* null and *EcRB* hypomorph P-element insertion mutants can be rescued by either *EcRA*, *EcRB1* or *EcRB2* transgene expressed under the control of a heat shock promoter. The rescue of different alleles was dependent on the amount of EcRB protein synthesized in the mutant. The weakest hypomorph allele (*P-5738*) was rescued most effectively by a single heat shock at the end of L3 stage, whereas the strongest alleles (*P-25*, *P40*) needed a second heat shock in prepupal stage. In contrast *P-9* allele, which is similar hypomorph for *EcRB1* and *EcRB2* as *P-25* and *P-40*, but wild type for *EcRA* and *EcRC*, is needed only a single heat shock. This result underlies that the redundant EcRA protein participates in the processes during metamorphosis.

During the molecular characterisation of P-insertion *EcR* alleles we noticed a general phenomenon, which explains how transposone insertions in introns can inactivate the gene expression. The selection marker gene carried by the transposone can disturb mRNA processing if integrated in the same orientation as the affected gene. Abnormal excision of introns and fusion of exons of the affected gene with exons of the selection marker gene occurs and a chimeric mRNA is produced.

KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

1. L. Mancinger, **O. Komonyi**, Zs. Antal, L. Ferenczy, A method for high-frequency transformation of *Trichoderma viride*. *Journal of Microbiological Methods*, 29: 207-210 (1997)
2. P. Deák, M.M. Omar, R.D.C. Saunders, M. Pal, **O. Komonyi**, J. Szidonya, P. Maroy, Y. Zhang, M. Ashburner, P. Benos, C. Savakis, I. Siden-Kiamos, C. Louis, V.N. Bolshakov, F.C. Kafatos, E. Madueno, J. Modolell and D.M. Glover, P element insertion alleles of essential genes on the third chromosome of *Drosophila melanogaster*: Correlation of physical and cytogenetic maps in chromosomal region 86E-87F. *Genetics*, 147: 1697-1722 (1997)
3. **O. Komonyi**, M. Mink, J. Csiha and P. Maroy, Genomic organisation of *DHR38* gene in *Drosophila*: Presence of *Alu*-like repeat in a translated exon and expression during embryonic development. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 38: 158-192 (1998)
4. S. Muratoglu, S. Georgieva, G. Pápai, E. Scheer, I. Enülü, **O. Komonyi**, I. Cserpán, L. Lebedeva, E. Nabirochkina, A. Udvardy, L. Thora and I. Boros, Two different *Drosophila* ADA2 homologues are present in distinct GCN5 histone acetyltransferase-containing complexes. *Molecular and Cellular Biology* (közlésre elfogadva 2002)