KROMOSZÓMA-SZÁM VÁLTOZÁS KIMUTATÁSÁRA ALKALMAS MÓDSZER KIDOLGOZÁSA ÉS JELLEMZÉSE DROSOPHILA MELANOGASTERREL

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

KÉSZITETTE: S O Ó S I S T V Á N
biológia-kémia
szakos tanár

B É K É S
1984

József Attila Tudományegyetem Központi Könyvtára
SZEGED
B 2588

Köszönetemet fejezem ki mindazoknak, akik hozzájárultak ahhoz, hogy e doktori értekezés elkészülhessen.

Mindenekelőtt hálával tartozom Szabad János kandidátusnak, a MTA Szegedi Biológiai Központja Genetikai Intézete főmunkatársának, aki irányitotta a munkámat, javaslataival és birálataival segitette e dolgozat megirását.

Köszönöm a MTA SZBK Genetikai Intézete vezetőinek a lehetőségek biztositását, a kutatási eszközök rendelkezésemre bocsátását.

Köszönöm a békési Mezőgazdasági Szakközépiskola igazgatójának, Dr Komáromi Sándornak segitő támogatását.

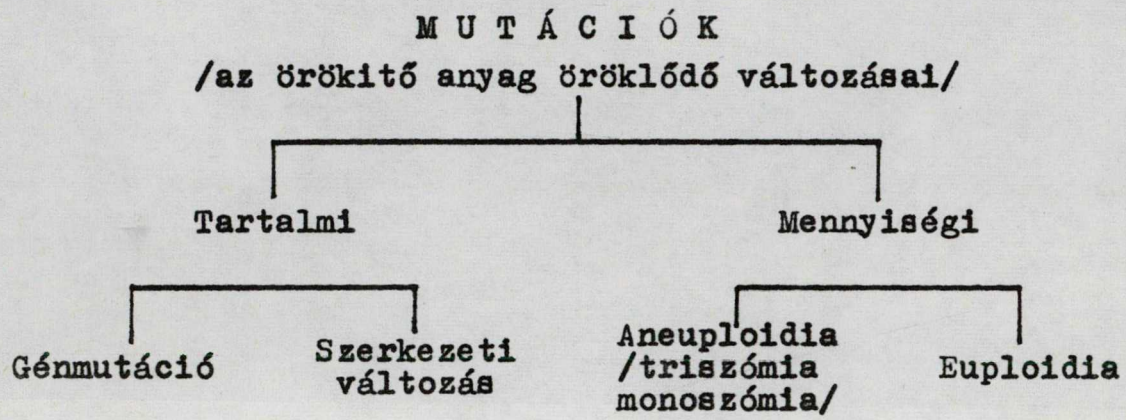
Köszönöm a feleségemnek a kisérletekhez nyujtott segitségét.

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	1. oldal
1.1. A nondiszjunkció "szerepe" az ember életében	2. "
2. Anyag és módszer	8. "
2.1. Mozaik foltok képződése	8. "
2.2. Nondiszjunkció és következményei	13. "
2.3. Nondiszjunkció a szülői törzsben	21. "
2.4. Az aneuploid utódok genetikai analizise	23. "
2.5. Kezelések	26. "
3. Eredmények	28. "
3.1. A colchicin toxicitása	28. "
3.2. Mozaikosság vizsgálatok	31. "
3.3. Nondiszjunkció	37. "
3.3.1. Nondiszjunkció a kontrollban	37. "
3.3.2. Nondiszjunkció a lárvák kezelése után	40. "
3.3.3. Nondiszjunkció nőstények colchicin oldattal történő injekciója után	43. "
4. Az eredmények értékelése	49. "
4.1. A nondiszjunkciós teszt érzékenysége	50. "
4.2. Nondiszjunkció a lárvák és az imágók kezelése után	52. "
4.3. Nondiszjunkció a szomatikus sejtekben	60. "
5. Irodalom	62. "

1. Bevezetés

Az iparban, a mezőgazdaságban, gyógyászatban, az élet legkülönbözőbb területén felhasznált vegyszerek, sugárzások kiválthatják az élőlények örökitő anyagának maradandó változását, mutagén hatásuak lehetnek. A mutagén hatás jelentheti az örökitő anyag tartalmi és/vagy mennyiségi változását / 1. ábra /.A tar-



1.ábra: A mutáció-tipusok osztályozása

talmi változások két csoportra oszthatók. A DNS egészen kis területén bekövetkező minőségi változást gén- vagy pontmutációnak nevezik. A változás második esetét a szerkezeti változások jelentik, amelyek alapja a kromoszómák törése /Igali, 1977; Szabad, 1984/. Az örökitő anyag mennyiségi változása érintheti az egész genomot, vagy gyakrabban csak néhány kromoszómát. Ha a változás az egész genomot érinti, a létrejövő utódsejtek vagy utódok a teljes kromoszóma-szerelvényt a szokásosnál több vagy kevesebb példányban hordozzák, <u>euploidia</u> alakul ki. Ha a kromoszómák számának változása csak egy vagy néhány kromoszómát érint <u>aneuploidiáról</u> beszélünk. Az eu- és az aneuploidiának az az oka, hogy a kromoszómák a sejtosztódás

során rendellenesen oszlanak meg az utódsejtek között. A kromoszómaszám változása bekövetkezhet testi sejtekben a mitózis, de az ivarsejtek képződése folyamán, az első vagy a második meiotikus osztódás alatt is. Az aneuploidia leggyakoribb oka a nondiszjunkció és a kromoszóma elimináció, de előfordulhatnak egyéb mechanizmusok is, mint pl. a nonkonjunkció: ilyenkor a homológ kromószómák valamilyen oknál fogva nem állnak párba. A nondiszjunkció esetében többnyire a huzófonalak funkciója sérült. A nondiszjunkció eredményeképpen a két utódsejt egyike a normálisnál több, a másika pedig a rendesnél kevesebb kromoszómát hordoz. A diploid sejtek mitotikus vagy meiotikus osztodásakor bekövetkező nondiszjunkciót elsődleges nondiszjunkciónak nevezik, az aneuploid sejtekben bekövetkező nondiszjukciót pedig másodlagos nondiszjunkciónak.

1. 1. A nondiszjunkció "szerepe" az ember életében

A fejlett egészségügyi kulturáju országokban is komoly problémát jelentenek a veleszületett fejlődési rendellenességek, amelyek egy része a nondiszjunkció következménye. Az aneuploidia szerepe a csecsemőhalálozásban betöltött aránya miatt növekszik, mivel a fertőző betegségeket, táplálkozási hiányártalmakat, mint a gyerekhalálozás fő okait az utóbbi években sikerült visszaszoritani.

Az emberi kariotipus 22 pár testi és 2 nemi kromoszómából áll. A kromoszómaszám rendellenességgel született gyerekek kariotipusa többnyire nem 46, hanem ennél több, ritkábban kevesebb kromoszómából áll. A kromoszómák azonositása után megállapitották, hogy az aneuploidia az élve született csecsemők esetében

általában valamelyik kisebb autoszómára, vagy a nemi kromoszómákra terjedt ki: a szokásos két kromoszómával szemben hármat hordoztak. Az élve született gyermekek 0,5 %-ában fordul elő triszómia. A triszómia egy része már a csecsemő vagy gyerekkorban halálhoz vezet. Amennyiben az aneuploidia valamely nagyobb autószómát érinti a magzat elpusztul, ami spontán abortuszt eredményez. Ezt igazolja, hogy spontán abortumok 30 %-ának kariotipusában figyelhető meg a normálisnál több kromoszóma. A monoszómia, az aneuploidiának az az esete, amelyben a kariotipus a szokásosnál eggyel kevesebb kromoszómából áll, viszonylag ritka az élve született csecsemők között. A spontán abortumokban is csak 2 % az előfordulásuk. Szakértők véleménye szerint a monoszómiás embriók a fejlődés legkoraibb szakaszában elpusztulnak. Az is feltételezhető, hogy a kromoszómahiányos ivarsejtek csökkent termékenyitő-képességüek /Sutton, 1980/.

Néhány kromoszóma triszómiája sulyos testi és szellemi fogyatékossággal jár, de nem, vagy csak a gyerekkor későbbi szakaszában vezet halálhoz. Ezek közül a legismertebbek előfordulását, jellemzőit az 1. táblázatban foglaltuk össze.

Az aneuploidia nem csak az autoszómákat, hanem a nemi kromoszómákat is érintheti. Az ivari kromoszómák számbeli eltéréseinek főbb tipusait, jellegzetességeit a 2. táblázatban foglaltuk össze.

Nondiszjunkció nem csak a meiozis folyamán következhet be, hanem a szomatikus sejtek osztódása, a mitózis során is. A szomatikus sejteket érintő nondiszjunkció következtében a sejtek a rendesnél több vagy kevesebb kromoszómát hordoznak, és ha az aneuploid sejtek életképesek a hordozó egyedek mozaikok: szöveteiket a normális kariotipusu sejtek mellett monoszómiások

1.táblázat: Az élve született triszómiás gyermekek főbb jellemzői /Sutton, 1980 nyomán/

A kromoszóma jele	Születési gyakoriság /ezrelék/	Fontosabb jellemzőik	A nondiszjunkció helye
21.	1-2	Down-kór /mongol idiotizmus/. Csökkent fizikai és szellemi képességek.	Többnyire az anyában. Előfordulásának gyakorisága nő az anyák életkorával
8.	nem ismert	Értelmi fogyatékosság.	Nem ismert.
13.	0,1	Patau-kór. Idegrendszeri elváltozások. 1 éves kor előtti halál.	Többnyire az anyában. A növekvő anyai életkor hatása kimutatható.
18.	0,2	Edwards-kór. Általános sorvadás. Gyakran letális.	Gyakran az anyában. A növekvő anyai életkor hatása kimutatható.
22.	nem ismert	Leggyakrabban letális. Túlélés esetén skizofrénia.	Nem ismert.

József Attila Tudományegyetem Központi Könyvtára SZEGED

2.táblázat: A nemi kromoszómákat érintő aneuploidia fontosabb tipusai és jellemzői /Sutton, 1980 nyomán/

Nemi kromoszómák	Előfordulásuk gyakorisága /ezrelék/	A hordozó neme	Jellegzetességeik
XO	0,4	♀	Turner szindróma. Testi fejletlenség. A peteképzés hiányzik.
XXY	22	♂	Klinefelter szindróma. Nőies testalkat. Sterilitás.
XXX	1,2	♀	Nincs egységes kórkép. Magas növés, csökkent intelligencia és reakcióképesség.
XYY	1,5	♂	Nincs egységes kórkép.

és/vagy triszómiások alkotják. Ha a testi szöveteknek csak kis része aneuploid, annak a fejlődésre gyakorolt hatása kicsi lehet, esetleg észre sem vehető. Minél korábban következik be a nondiszjunkció az egyed fejlődés során, annál inkább érezhető az aneuploidia hatása. Nem, vagy csak alig ismert, hogy az aneuploid sejteknek a szervezeten belüli elhelyezkedése milyen szerepet játszik a kórkép megnyilvánulásában. A mozaikosságnak elsősorban a Down-kór vonatkozásában vannak jól ismert esetei, de triszómiás mozaikosságot leirtak más kromoszómákra is /pl. 8.,19., 22./.

A triszómiás mozaikosság érintheti az ősivarsejteket is. Az ilyen egyedeknek - másodlagos nondiszjunkció során - aneuploid ivarsejtjeik képződnek és utódaik között gyakoriak a betegek /pl. a 21. kromoszóma esetében Down-kórosak/. A szakirodalomban ilyen esetek ismertek /Sutton, 1980/.

A nemi kromoszómák nondiszjunkciója - ugyanugy, mint az autoszomáké - a testi sejtek osztódása során is bekövetkezhet. Egy ilyen esemény a nemi kromoszómákat rendellenes számban hordozó utódsejtek képződéséhez, végeredményben pedig mozaikossághoz vezet. A szakirodalomban leirtak ilyen tipusu mozaikosságot és feltételezik, hogy néhány XO, Turner-szindrómát mutató nő mozaikos volt, gonádjában XX kromoszómákat hordozó sejtek is voltak, és e miatt utódaik származhattak.

Az örökitő anyag minőségi vagy mennyiségi változása spontán is bekövetkezhet. Előfordul azonban az is, hogy valamilyen hatás, pl. vegyszer vagy sugárzás váltja ki. A világon, becslések szerint évente mintegy 30 ezer uj vegyületet állitanak elő, olyanokat, amilyenekkel az élőlények evolúciójuk folyamán nem talál-

koshattak. E vegyületek némelyikének, elsősorban a mindennapok gyakorlatában felhasználandóknak a mutagén hatását meg kell vizsgálni. Erre a feladatra az ugynevezett mutagén tesztek alkalmasak, amelyek megmutatják, hogy képesek e a vegyületek génmutációkat és/vagy kromoszómatöréseket kiváltani. A mutagén hatás kimutatására többféle módszer is ismeretes /AMES-teszt, profág indukciós teszt Drosophila mozaik teszt, nemiez kötött recesszív letális teszt, mikronukleusz teszt stb./. Nincs azonban rutinszerűen használható módszer a nondiszjunkció kimutatására. Egy ilyen tesztre egyre nagyobb szükség van, mivel az elmult években derült arra fény, hogy az aneuploid sejtek gyakran rákos daganatok kiinduló helyei, különösen gyakran képződik belőlük a leukémia /többnyire limfoid leukémia/.

Aspergillus nidulans felhasználásával M. de Bertoldi és M. Grisselli 1980-ban irtak le egy módszert, amely nondiszjunkció kimutatására alkalmas /mitotikus génkonverzió és mitotikus rekombináció egyidejü vizsgálatával /. Mi 1983-ban közöltük az ugynevezett Drosophila mozaik tesztet, amely szomatikus és ivarsejtvonal sejtekben bekövetkező kromoszómatörések és génmutációk egyidejü kimutatására alkalmas /Szabad és munkatársai, 1983/. Ez utóbbi teszt-rendszer kibővitése lehetővé teszi X kromoszóma nondiszjunkció kimutatását is.

A doktori értekezés a nondiszjunkció kimutatására alkalmas teszt-rendszer elvi alapjaival és a colchicinnel indukált nondiszjunkcióra vonatkozó vizsgálatok eredményeivel foglalkozik. Választ kerestünk arra a kérdésre is, hogy: okozhatja-e nondiszjunkció a testi sejtekben megfigyelhető mozaik foltok némelyikét.

2. Anyag és módszer

2. 1. Mozaik foltok képződése

A vizsgálatainkban használt egyedeket a y w^{co}/y w^{co}; flr^3 se/TM2, Ubx^{130} se X fs(1)K10 w/B^sY; mwh se/mwh se keresztezésből nyertük /4. táblázat/. A y, w^{co}, w és K10 az X vagy 1., az mwh, flr^3 és a se pedig a 3. kromoszómához kötött un. marker mutációk, melyek jellegzetességeit a 3. táblázatban foglaltuk össze. A B^sY egy olyan Y kromoszóma jele, amely egy olyan X kromoszómából származó darabkát hordoz, amelyen a B, résalaku szemet okozó mutáció lokalizált.

A 4. táblázat tetején lévő keresztezésből származó y w^{co}/fs(1)K10 w és y w^{co}/B^sY utódokat szokás lárva korukban kitenni a feltehetően mutagén hatásnak /esetünkben colchicinnek/, majd miután imágokká fejlődnek megvizsgálni, hogy képződtek-e szemeikben és/vagy szárnyaikon mozaik foltok. A kontroll szintjét szignifikánsan meghaladó mozaik folt-gyakoriság mutagén hatást jelez /Szabad és munkatársai, 1983./. A mozaik foltok többnyire a kromatidák törését követő mitotikus rekombináció után képződnek /2.ábra/: a kromatida részek cseréje után olyan leánysejtek képződnek, amelyek az a és b recessziv marker mutációkat homozigóta állapotban hordozzák. A mitotikus rekombináció szem-/szárny-/ kezdemény sejtekben játszódik le, a marker mutációra homozigóta, "genetikailag jelzett" sejtek a lárva élete folyamán osztódnak, majd a bábállapot végére mozaik foltot képeznek: a homozigóta sejtek a mutáns tulajdonságokat kifejezik. Igy képződnek a w// w^{co} ikerfoltok / 3. ábra/ vagy, ha a 3. kromoszóma bal karját érinti a mitotikus rekombináció, az mwh// flr^3 ikerfoltok /4. ábra/. Ikerfoltok elvileg képződhetnek kettős non-

3. táblázat: Marker mutációk és jellegzetességeik

A mutáció jele	Helyzete[a]	F e n o t i p u s a
y /yellow/	1-0,0	Sárga test
w /white/	1-1,5	Fehér szem
w^{co} /white coral/	1-1,5	Korall piros szem. A w-tal allélikus
fs 1 K10	1-0,3	Nőstény sterilitás, abnormális pete /6. ábra, 33. oldal/
mwh /multiple wing hairs/	3-0,0	2-7 szőr szárnysejtenként a szokásos eggyel szemben /4. ábra, 12. oldal/
flr^3 /flare/	3-	Bolyhos, abnormális szárnyszőrzet /4. ábra/
se /sepia/	3-	Sötét szemszin. A szem mozaikosságának jobb megfigyelhetőségéhez
B /Bar/	1-	Domináns résalaku szem. A B^sY annak az Y kromoszómának a jele, amely az X kromoszómának azt a darabkáját hordozza, melyen a B mutáció lokalizált.

a, az első szám azt a kromoszómát jelöli, amelyen az illető mutáció lokalizált, a második a térképhelyzetet

Szülők $X\,X \times X\,B^sY$

Első generáció $X\,X \times X\,B^sY$

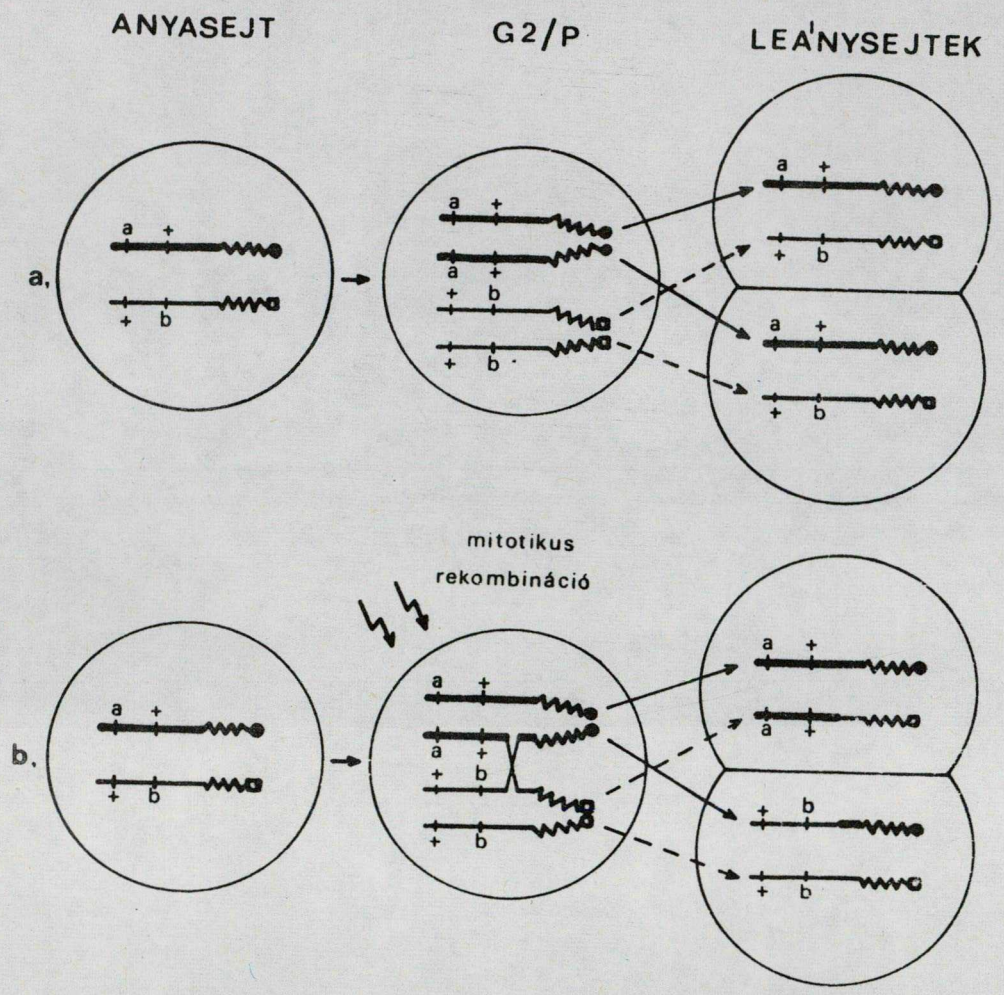
Második generáció

Női ivarsejtek \ Himivarsejtek			"Rendesen"		Nondiszjunkció után			
					Redukciós	Ekvációs		R + E
			X	B^sY	XB^sY	XX	B^sYB^sY	0
"Rendesen"		X	X X	X B^sY	X XB^sY	X XX	X B^sYB^sY	X 0
		X	X X	X B^sY	X XB^sY	X XX	X B^sYB^sY	X 0
Nondiszjunkció után	R	XX	XX X	XX B^sY	XX XB^sY	XX XX	XX B^sYB^sY	XX 0
	Ekvációs	XX	XX X	XX B^sY	XX XB^sY	XX XX	XX B^sYB^sY	XX 0
		XX	XX X	XX B^sY	XX XB^sY	XX XX	XX B^sYB^sY	XX 0
	R+E	0	0 X	0 B^sY	0 XB^sY	0 XX	0 B^sYB^sY	0 0

$X = y\ w^{co}$

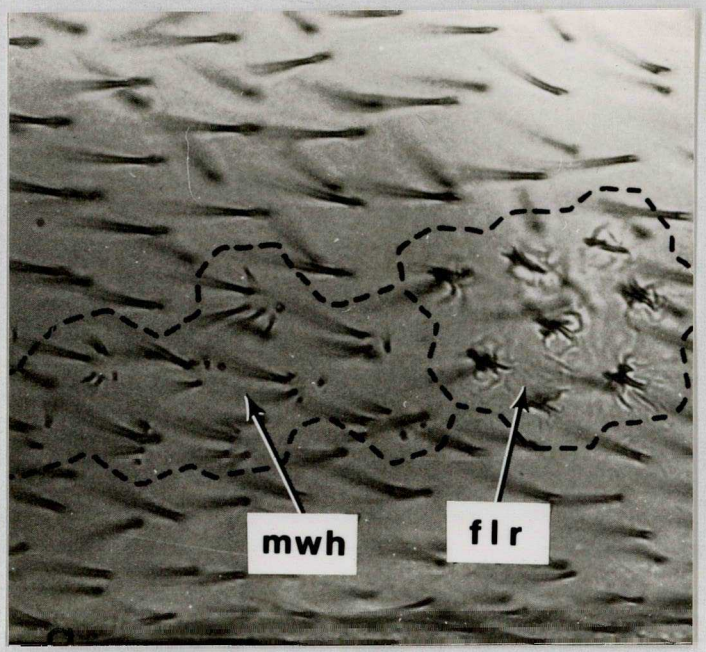
X = K10 w

4. táblázat: A szülők, az első és a második generáció genotipusai



2. ábra: A mitotikus rekombináció sémája

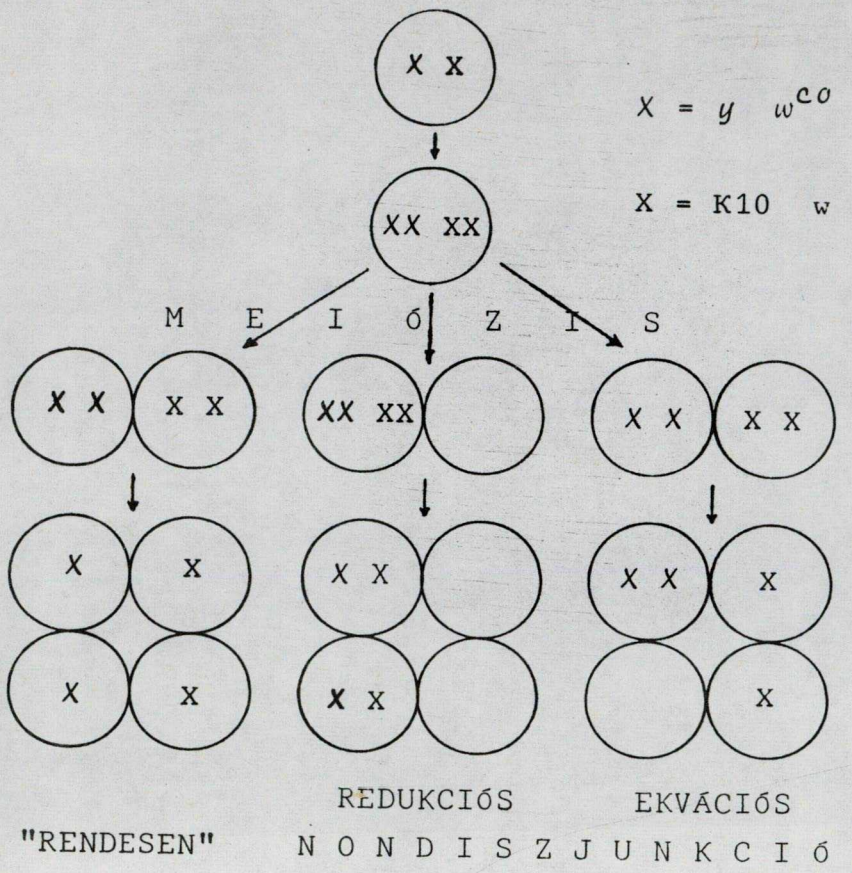
3. ábra: $\underline{w}/\underline{w}^{co}$ ikerfolt



4. ábra: mwh// flr ikerfolt

diszjunkció után is: ilyenkor a homológ kromoszóma pár anyai eredetü két kromatidája az egyik, az apai eredetüek a másik leánysejtbe jutnak / ugyanugy, mint az első meiotikus osztódás folyamán/ /5. ábra/ és mint diploid sejtek élnek tovább.

A mozaik foltok egy része magányos. Magányos foltok sokféleképpen képződhetnek. Pl. ha mitotikus rekombináció után az egyik leánysejt elpusztul. Az egyik allél deléciója vagy uj génmutáció indukciója is eredményezheti magányos foltok képződését, sőt nondiszjunkció is. Ilyen esetben az egyik leánysejtbe három /triszómia/ a másikba csak egy kromoszóma kerül /monoszómia/; a triszómiás sejt várhatóan nem mutatja a recesszív mutáció fenotipusát /pl. w/w/w^{co}/ a monoszómiás viszont igen /w^{co}/. Kérdés, hogy milyen a triszómiás és a monoszómiás sejtek életképessége.



5. ábra: A nondiszjunkció sémája

A w és w^{co} mutációkat a szem, az mwh és flr^3 mutációkat a szárny, az fs(1)K10 mutációt pedig az ivarsejt vonal mozaikosságának vizsgálatára használtuk. A y és w mutációk illetve a B^sY kromoszóma a nondiszjunkció kimutatását is lehetővé teszi.

2. 2. Nondiszjunkció és következményei

Az ivarsejtek képződése, a meiozis során egyetlen sejtből négy utódsejt származik, melyek egyszeres kromoszóma-szerelvényt tartalmaznak, haploidok. A meiozis lényegében két sejtosztódásból áll. A redukciós vagy első meiotikus osztódás során az apai és anyai eredetü, megkettőződött, két-két kromatidából álló ho-

mológ kromoszómák válnak szét, ugy, hogy az egyik leánysejtbe a homológ kromoszóma pár anyai, a másikba az apai eredetü tagja kerül. A második vagy ekvációs meiotikus osztódás során az iker kromatidák válnak el egymástól egy végeredményben mitotikus jellegü sejtosztódás folyamán /5. ábra/. Az eredmény négy haploid utódsejt, melyek közül kettő az apai, kettő pedig az anyai eredetü kromoszómákból hordoz egyet-egyet. A negyedik táblázatban látható példánkban az anyai eredetü, y w^{co} mutációkat hordozó kromoszómákat *X*-szel, az apai eredetü fs(1)K10 w mutációkat hordozókat pedig X-szel jelöltük. Megjegyezzük, hogy az első meiotikus osztódás profáziséban rekombináció játszódhat le a y és a w lókuszok között. Ennek gyakorisága kicsi /1,5 %/ és nem zavarja a nondiszjunkció kimutatását.

Nondiszjunkció mind az első mind a második meiotikus osztódás során bekövetkezhet. Ha a kromoszómák az első meiotikus osztódás során nem válnak szét redukciós nondiszjunkcióról szokás beszélni. Ilyen esetben valamennyi képződött petesejt a szokásostól eltérő számu kromoszómát hordoz: kettő a y w^{co} és a fs(1)K10 w mutációkat hordozó X kromoszómákból egyet-egyet hordoz, a másik két ivarsejt nem tartalmaz X kromoszómát /5. ábra/. Ha a kromoszómák nondiszjunkciója a második meiotikus osztódás során következik be ekvációs nondiszjunkcióról beszélünk. Ilyen esetekben a négy petesejt közül kettő normális számban hordoz X kromoszómát /példánkon a fs(1)K10 w mutációkkal jelölteket/. A harmadik ivarsejt vagy az anyai, vagy az apai eredetü kromoszómából kettőt hordoz, mig a negyedikben nincs nemi kromoszóma /5. ábra/. A diploid sejtekben bekövetkező nondiszjunkciót nevezik elsődleges nondiszjunkciónak. Az aneuploid sejtekből a meiozis után nagy gyakorisággal származnak rendellenes számban

kromoszómát hordozó ivarsejtek, amelyek az un. másodlagos nondiszjunkció következményei.

Az F_1 generációbeli egyedek "rendesen" olyan ivarsejteket képeznek, amelyekben egy X /vagy Y/ kromoszóma van /4. táblázat/. Ezeknek az ivarsejteknek a kombinációja után csupa épszemü nőstény és csupa résszemü him utód képződik a második generációban. A nőstények szeme nem fehér. Testük lehet sárga /y homozigóta/ és barna /y heterozigóta/. A himek fele sárga testü és piros szemü /y $w^{co}/B^{s}Y$/, fele barna testü és fehér szemü /w/$B^{s}Y$/. Azokból az ivarsejtekből, melyek képződése során nondiszjunkció következett be megtermékenyités után aneuploid utódok származnak. Ezért figyelhető meg a nondiszjunkció következménye a második /F_2/ generációban. A nőstényekben lejátszódó redukciós vagy ekvációs nondiszjunkció után két X kromoszómát hordozó petesejtek képződnek /4. táblázat/. Ha ezeket X kromoszómát hordozó spermium termékenyiti meg három X kromoszómát hordozó un. szuper-vagy metanőstények képződnek, amelyek azonban többnyire nem életképesek. Ha az XX kromoszómáju petesejtek $B^{s}Y$ kromoszómát hordozó himivarsejttel termékenyülnek meg $XXB^{s}Y$, résszemü nőstény utódok származnak. Ezek lehetnek y w^{co}/fs(1)K10 w heterozigóták /redukciós nondiszjunkció után/, y w^{co} vagy fs(1)K10 w homozigóták /ekvációs nondiszjunkció után/. Mind a redukciós mind az ekvációs nondiszjunkció után képződnek olyan petesejtek, amelyek nem tartalmaznak X kromoszómát. Ha az ilyen petesejtek X-et tartalmazó himivarsejttel termékenyülnek meg XO, him utódok származnak, amelyek y w^{co} hemizigóták és mivel nem hordozzák a $B^{s}Y$ kromoszómát, szemük normális alaku. Az XO himek sterilek. Ezért, hogy az Y kromoszóma hányáról meg-

győződjünk, az épszemü himeket szüz nőstényekkel kereszteztük és feljegyeztük, hogy származtak-e utódaik. A B^sY kromoszómát tartalmazó himivarsejt és az X kromoszómát nem hordozó petesejt egyesüléséből nem jön létre életképes embrió sem.

Ha a himekben redukciós nondiszjunkció következik be y w^{co} és B^sY kromoszómákat, illetve nemi kromoszómákat nem hordozó ivarsejtek képződnek. Ekvációs nondiszjunkció után XX vagy B^sY B^sY kromoszómákat hordozó ivarsejtek képződnek és ezek mellett nemi kromoszómákat nem hordozók is. Ezeknek az ivarsejteknek és az X kromoszómát hordozó női ivarsejteknek a fuziójából képződhetnek XXX metanőstények, XX B^sY résszemü nőstények, X B^sY B^sY himek /amelyek nem különithetők el az X B^sY himektől/ és épszemü XO himek /4. táblázat/. Az XO himek kétfélék: a már ismert y w^{co} /sárga test, piros szem/ mellett barna testü és fehér szemü /w/ is képződhet./A 4. táblázat jobb alsó részében azokat a genotipusokat tüntettük fel, amelyek nondiszjunkció után képződő ivarsejtek fuziója után jöhetnek létre. Ezekkel a lehetőségekkel részletesen nem foglalkozunk, mivel előfordulásuknak kicsi a valószinüsége./

A 4. táblázatban vázolt lehetőségek és a lehetséges fenotipusok alapján bizonyos mértékig a nondiszjunkció helyére is következtethetünk: ti. a nondiszjunkció a nőstényekben vagy himekben, a redukciós vagy az ekvációs osztódás folyamán következett-e be. Az ide vonatkozó megállapitásokat az 5. táblázat foglalja össze, amely alapján pl. kitünik, hogy barna testü és piros szemszinü, résszemü nőstények csak redukciós

5. táblázat:

Fenotipusok a 2. generációban

	Testszín	S szín	Z	E alak	M	A nondiszjunkció helye Nőstényben Reduk.	Ekv.	Hímben Reduk.	Ekv.
Rendesen									
Nőstények	sárga	piros		normális		-	-	-	-
	barna					-	-	-	-
Hímek	sárga	piros		rés		-	-	-	-
	barna	fehér		rés		-	-	-	-
Nondisz-junkció után									
	barna	piros		RÉS		+	-	+	-
Nőstények	sárga	piros		RÉS		-	+	+	-
	barna	FEHÉR		RÉS		-	+	-	-
Hímek	sárga	piros		NORMÁLIS		+	+	+	+
	barna	fehér		NORMÁLIS		-	-	+	+

nondiszjunkció után származhatnak /amely azonban a nőstényekben és a himekben is lejátszódhat/, vagy pl. hogy barna testü és fehér szemszinü, épszemü XO himek csak a himekben lejátszódó nondiszjunkció eredményeként képződhetnek.

Az eddigiekben leirtak alapján lehetőség látszik nondiszjunkciók kimutatására a második generációban. Arra, hogy valamely kezelés okoz-e nondiszjunkciót, ugy válaszolhatunk, hogy a kezelés hatására szignifikánsan megnövekszik-e a kontrollhoz képest a résszemü nőstények és az épszemü himek gyakorisága.

Nondiszjunkciót követően az ivarsejtek 16/24-ed része /66,7 %-a/ hordoz rendellenes számban nemi kromoszómát /kettőt vagy egyet sem a szokásos eggyel szemben/, a fennmaradó 8/24-ed

részben viszont egy-egy X vagy B^sY kromoszóma van. Az előbbi ivarsejtekből származhatnak a várttól eltérő fenotipusu, nondiszjunkciót jelző utódok. Az egyes ivarsejt-féleségek relativ gyakorisága alapján várható, hogy a nondiszjunkciót jelző különböző fenotipusu utódok eltérő gyakorisággal képződnek. Feltételezve, hogy 1. a spontán nondiszjunkció gyakorisága a nőstényekben és a himekben azonos, valamint 2. azonos gyakorisággal következik be a redukciós és az ekvációs osztódások folyamán, kiszámitható, hogy milyen arányban képződnek nondiszjunkció után olyan ivarsejtek, amelyek rendellenes számu nemi kromoszómát hordoznak / 6. táblázat/. A rendellenes számban kromoszómát hordozó ivarsejtek megtermékenyülése után 8-8 féle zigóta képződik eltérő gyakorisággal, amelyek 31,25 %-a /10/16-oda/ elpusztul /az un. triplo-X nőstények és az X kromoszómát nem hordozók/. A tuléló embriókból fejlődő utódok 12,5 %-a /2/16-oda/ nem ismerhető fel /a két B^sY kromoszómát hordozók/, 43,75 %-a viszont 5 jól felismerhető fenotipusu utóddá fejlődik. Az általunk felépitett rendszerben 50 % az esély a himben bekövetkező nondiszjunkció kimutatására, mig a nőstényekben bekövetkezőkre 33,3 %. Az itt elmondottak alapján kiszámitható, hogy a nondiszjunkcióból származó különböző fenotipusu utódok milyen relativ gyakorisággal jelennek meg a második generációban /a 6. táblázat utolsó oszlopa/.

Elméletileg van esély arra, hogy egyetlen nondiszjunkciós esemény két termékét detektáljuk. Pl. az F_1 nőstényekben lejátszódó redukciós nondiszjunkció után két-két XX és O nemi kromoszómák hordozó ivarsejt képződik /5. ábra/. Ezek mindegyike X vagy B^sY kromoszómát hordozó spermiummal fuzionálhat /4. táblázat/. A zigóták feléből fejlődik olyan utód, amely jelzi

6. táblázat Az F_1 utódokban bekövetkező nondiszjunkció és következményei az ivarsejtek, a zigóták és az utódok szintjén

A nondiszjunkció helye		Az ivarsejtek tipusa és	relatív gyakorisága	Az F_2 lehetséges zigóták tipusai és	relatív gyakorisága	Az F_2 utódok tipusa és	relatív gyakorisága	Az F_2 utódok fenotipusa és	relatív gyakorisága
Nőstényben	Reduk.	XX	2/12	XXX vagy XXB^SY	2/16	XXB^SY	2/ 8		
	Ekvác.	XX	1/12	XXX vagy XXB^SY	1/16	XXB^SY	1/ 8	Nőstények: XXB^SY-barna piros RÉS	10
	Ekvác.	XX	1/12	XXX vagy XXB^SY	1/16	XXB^SY	1/ 8	Nőstények: XXB^SY-sárga piros RÉS	3
	R + E	O	4/12	XO vagy O B^SY	4/16	XO	4/ 8	Nőstények: XXB^SY-barna FEHÉR RÉS	7
Himben	Reduk.	XB^SY	2/12	XXB^SY vagy XXB^SY	2/16	XXB^SY	2/12		
	Ekvác.	XX	1/12	XXX vagy XXX	1/16	XXB^SY	2/12	Hímek: XO — sárga piros NORMÁLIS	20
	Ekvác.	B^SYB^SY	1/12	XB^SYB^SY vagy XB^SYB^SY	1/16	XO	4/12	Hímek: XO — barna fehér NORMÁLIS	8
	R + E	O	4/12	XO vagy XO	4/16	XO	4/12		

Megjegyzés: O a hiányzó nemi kromoszóma jele.

a nondiszjunkciót. Annak a valószinüsége pedig, hogy mindkét, a nondiszjunkció után képződő petesejtből felismerhető utód származik /a két X kromoszómát tartalmazó petesejt Y kromoszómát hordozó spermiummal, a nemi kromoszómát nem tartalmazó pedig X kromoszómát hordozó spermiummal fuzionál/ = 1/2 x 1/2 = 25 %. A himekben bekövetkező redukciós nondiszjunkció után képződő spermiumok /X $B^{s}Y$ vagy O nemi kromoszómákat hordozók/ bármilyen petesejttel is fuzionáljanak /X vagy Y/, a nondiszjunkciót jelző utódok képződnek. Ezért nagy /elvileg 100 %/ annak esélye, hogy egyetlen redukciós nondiszjunkció két termékét detektáljuk az F_2 generációban.

Az ekvációs nondiszjunkció után - akár nőstényben, akár himben is játszódjon le - annak az esélye, hogy egyetlen nondiszjunkció mindkét termékét kimutassuk csupán 6,25 % /1/16/. Ez azért van, mert 1. az ivarsejtek fele csak egy nemi kromoszómát hordoz /6. táblázat/, 2. a zigóták egy része elpusztul /2/16-oda, a 3X kromoszómát hordozók/ és 3. olyan fenotipusu utódok származnak belőlük, amelyek fenotipusukban nem különböznek azoktól, amelyek nondiszjunkció nélkül képződnek /2/16-od, 6. táblázat/. Feltételezve, hogy a nondiszjunkció a nőstényekben és a himekben valamint a meiózis redukciós és ekvációs osztódásában egyforma gyakorisággal következik be, annak, hogy egyetlen nondiszjunkció mindkét termékét észrevegyük <u>átlagosan</u> 34,375 % a valószinüsége.

2. 3. Nondiszjunkció a szülői törzsben

Régóta ismert, hogy az X kromoszóma nondiszjunkciója Drosophilában, kis gyakorisággal spontán is bekövetkezhet. Ha nondiszjunkció abban a törzsben következhe be, amelyből a szülő, $\underline{y}\ \underline{w}^{co}/\underline{y}\ \underline{w}^{co}$ nőstények származnak /4. táblázat/, a szülőként kiválasztott $\underline{y}\ \underline{w}^{co}$ fenotipusu nőstények között $\underline{y}\ \underline{w}^{co}/\underline{y}\ \underline{w}^{co}/Y$ genotipusuak is lehetnek. Tőlük származhatnak - másodlagos nondiszjunkció után - az első generációban XXY nőstények és XY himek is /7. táblázat/. Az XY himek felismerhetők /fehér szemük normális alaku/, az XXY nőstények nem. A 4. táblázatban bemutatott keresztezésből XXY és XY kromoszómákat hordozó utódok nem származhatnak az F_1 generációban. Amennyiben a második generációtlétrehozó szülők közé XXY nőstény kerülne, ugy az F_2 generációban Y, sárga testü és épszemü himek jelenhetnek meg /amelyek fertilisek/ és XX B^sY nőstények is, melyek nem különböznek az elsődleges nondiszjunkció eredményeként képződő részszemü nőstényektől /vesd össze a 4. és 7. táblázatokat/. Vagyis az XX/$\underline{y}\ \underline{w}^{co}$/ törzsben bekövetkező nondiszjunkció nemkivánatos következményekkel járhat. Ezért az XX/$\underline{y}\ \underline{w}^{co}$/ törzs himjei olyan Y kromoszómát hordoznak, amelyre az X kromoszóma kis, $\underline{y}^+$ gént hordozó darabkája transzlokálódott. Ezért a törzsben bekövetkező nondiszjunkció után képződő XXy^+Y nőstények felismerhetők /testük nem sárga, hanem barna/ és a törzsből kiszürhetők. Megjegyezzük, hogy az XXy^+Y nőstények és az XO himek kb. 10^{-3}-os gyakorisággal képződnek az XX/y^+Y törzsben.

7. táblázat Egy XXY szülői nőstény utódai között az első generációban az XXY /*-gal jelölt/ nem ismerhető fel. Az XXY nőstény utódai között az elsődleges nondiszjunkció látszatát keltő XXB^sY nőstények képződhetnek.

$X = y\ w^{co}$ X = K10 w

Szülők X X Y x X B^sY

Első generáció

Női ivarsejtek \ Hímivarsejtek	X	B^sY
X	X X	X B^sY
XY	X X Y*	XY B^sY
XX	X X X	XX B^sY
Y	X Y	Y B^sY

X X Y x X B^sY

Második generáció

Női ivarsejtek \ Hímivarsejtek	X	B^sY
X	X X	X B^sY
XY	X X Y	XY B^sY
XX	XX X	XX B^sY
Y	X Y	Y B^sY

2. 4. Az aneuploid utódok genetikai analizise

A második generációban /4. táblázat/ megjelenő aneuploid résszemü nősténveket egyenként vizsgáltuk meg abból a szempontból, hogy milyen utódokat és milyen arányban szegregálnak. Az utódok vizsgálata jelzi, hogy a szét nem váló kromoszómák kapcsolata ideiglenes vagy tartós volt-e. Hasonlóan, az épszemü himeket is egyenként megvizsgáltuk, hogy fertilisek-e, hordoznak-e Y kromoszómát.

A résszemü nőstények $\chi B^{s}Y$ vagy X $B^{s}Y$ testvér himekkel párosodhattak / 4. táblázat/. Amennyiben szüzek voltak $\chi/y^{+}Y$ himekkel párositottuk őket. Feltételezve, hogy az X és az Y kromoszómák az ivarsejtek között a másodlagos nondiszjunkció folyamán véletlenszerüen oszlanak meg kiszámitható, hogy az aneuploid nőstényektől milyen utódok származhatnak /8. táblázat/. Mivel az XX $B^{s}Y$ genotipusu nőstények az fs(1)K10 mutációra homozigóták csak K10 petéket raknak. Ezekből a jellegzetes alaku petékből /6. ábra/ nem fejlődnek utódok. A 8. táblázat adatai

6. ábra: Normális és K10 pete

8. táblázat Az aneuploid /XXB^sY és XXB^sY/ nőstények lehetséges utódai különböző genotipusu /XB^sY, vagy XB^sY esetleg Xy^+Y/himekkel történő párosodás után

A nőstények genotipusa	Ivarsejtek	A himek genotipusa					
		$X\ B^sY$		$X\ B^sY$		$X\ y^+Y$	
		X	B^sY	X	B^sY	X	y^+Y
XXB^sY	X	XX	$X\ B^sY$	XX	$X\ B^sY$	XX	$X\ y^+Y$
	$X\ B^sY$	$XX\ B^sY$	$X\ B^sYB^sY$	$XX\ B^sY$	$X\ B^sYB^sY$	$XX\ B^sY$	$X\ B^sYy^+Y$
	X	XX	$X\ B^sY$	XX	$X\ B^sY$	XX	$X\ y^+Y$
	$X\ B^sY$	$XX\ B^sY$	$X\ B^sYB^sY$	$XX\ B^sY$	$X\ B^sYB^sY$	$XX\ B^sY$	$X\ B^sYy^+Y$
	XX	XXX	$XX\ B^sY$	XXX	$XX\ B^sY$	XXX	$XX\ y^+Y$
	B^sY	$X\ B^sY$	B^sYB^sY	$X\ B^sY$	B^sYB^sY	$X\ B^sY$	B^sYy^+Y
XXB^sY	X	XX	$X\ B^sY$	XX	$X\ B^sY$	XX	$X\ y^+Y$
	$X\ B^sY$	$XX\ B^sY$	$X\ B^sYB^sY$	$XX\ B^sY$	$X\ B^sYB^sY$	$XX\ B^sY$	$X\ B^sYy^+Y$
	XX	XXX	$XX\ B^sY$	XXX	$XX\ B^sY$	XXX	$XX\ y^+Y$
	B^sY	$X\ B^sY$	B^sYB^sY	$X\ B^sY$	B^sYB^sY	$X\ B^sY$	B^sYy^+Y
XXB^sY		Csak K10 peték		Csak K10 peték		Csak K10 peték	

X = $y\ w^{co}$ X = K10 w

9. táblázat Az aneuploid /XX B^sY és XX B^sY/ nőstények lehetséges utódainak megoszlása fenotipusuk és gyakoriságuk szerint különböző genotipusu /XB^sY vagy XB^sY esetleg Xy^+Y/ himekkel történő párosodás után. X = y w^{co} X = K10 w

A nőstények genotipusa	AZ UTÓDOK				A himek genotipusa		
	Neme	Testszine	Szem Alakja	Szem Szine	XB^sY	XB^sY	Xy^+Y
X X B^sY	Nőstények	sárga	Rés	piros	1	0	1
			normális	piros	1	0	1
		barna	Rés	fehér	0	1	0
				piros	2	2	1
			normális	fehér	0	1	0
				piros	1	1	2
	Himek	sárga	Rés	piros	3	2	1
		barna	Rés	fehér	2	3	1
				piros	0	0	1
			normális	fehér	0	0	1
				piros	0	0	1
X X B^sY	Nőstények	sárga	Rés	piros	2	1	1
			normális	piros	1	0	1
		barna	Rés	piros	0	1	0
			normális	piros	0	1	1
	Himek	sárga	Rés	piros	3	2	1
		barna	Rés	fehér	0	1	0
				piros	0	0	1
			normális	piros	0	0	1

Megjegyzés: a számok a várható relativ gyakoriságokat jelölik.

alapján állitottuk össze a 9.-et, amely megmutatja, hogy az XX B^sY és az XXB^sY nőstényeknek milyen utódaik és milyen arányban képződhetnek attól függően, hogy milyen himmel párosodtak. Megjegyzendő, hogy egy Drosophila nőstény csak egy himmel párosodik, majd a testében raktározott spermiumok termékenyitik meg a petéket; ezért nem várható, hogy egy nőstény különböző himektől származó utódoknak adjon életet.

2. 5. Kezelések

A kisérleteinkben használt colchicint a MICROMÉ cég gyártotta. Nagyon tiszta preparátum volt. Vele Drosophila lárvákat és nőstény imágókat kezeltünk.

A 4. táblázatban feltüntetett genotipusu szülőktől származó lárvákat helyeztünk olyan táptalajra, amelybe különböző koncentrációban colchicint kevertünk /0,1; 0,5; 1,0; 3,0; 5,0; 7,0; 10,0 és 20 µg/ml/. Fiatal harmadik stádiumu lárvákat helyeztünk a táptalajra, mintegy egy órával a táptalaj elkészitése után.

Figyeltük, hogy 1. Hány nap mulva bábozódtak be a lárvák,
2. A lárváknak hányad része bábozódott be,
3. A lárvák hányad része fejlődött imágóvá,
4. A bábok hányad része pusztult el /un. farát adultok/.

Az 1-4 alatt felsorolt jellemzők a colchicin toxicitásáról adnak felvilágositást. A kezelést tulélő imágókat vizsgáltuk:

A. Megvizsgáltuk a szemek mozaikosságát
B. Megvizsgáltuk a szárnyak mozaikosságát

Az F_1 nőstényeket testvéreikkel párosítottuk /4. táblázat/ majd

C. Megvizsgáltuk a lerakott peték alakját /van-e köztük Klo pete, esetleg abnormális alaku/. Néhány kisérletben megszámoltuk a petéket.

D. Figyeltük, hogy az F_2 generációban származnak-e aneuploid utódok. Az aneuploid utódok legtöbbjét tovább vizsgáltuk abból a szempontból, hogy milyen utódaik származnak.

E. Néhány steril nőstényt felboncoltunk és megvizsgáltuk petefészkeiket.

Az adult nőstények kezelése során potrohukba injektáltunk különböző koncentrációju colchicin oldatot /5; 10; 20; 50; 100; 500 és 1000 µg/ml/. Amint azt izótóp jóddal folytatott kisérleteinkben meghatároztuk, egy átlagos injekció térfogata 0,20 ± 0,03 µl /átlag és szórás, n=11/. A nőstények az injekció időpontjában 0 vagy 5 naposak voltak, és az injekciót követően kereszteztük őket XB^sY himekkel. Nyomon követtük /nőstényenként vagy kis csoportokban/ a petetermelést, majd feljegyeztük az utódok számát és figyeltük az utódok fenotipusát is. Az aneuploid utódokat a D.pont alapján vizsgáltuk tovább.

Kontrollként a kezelt nőstények kezeletlen testvéreit használtuk. A kontroll nőstények egy részébe fiziológiás só oldatot injektáltunk. Mivel a kontroll csoportok között nem figyeltünk meg lényeges különbséget az adatokat összevontuk. Eredményeinket statisztikai módszerekkel értékeltük /Kastenbaum és Bowman, 1970./.

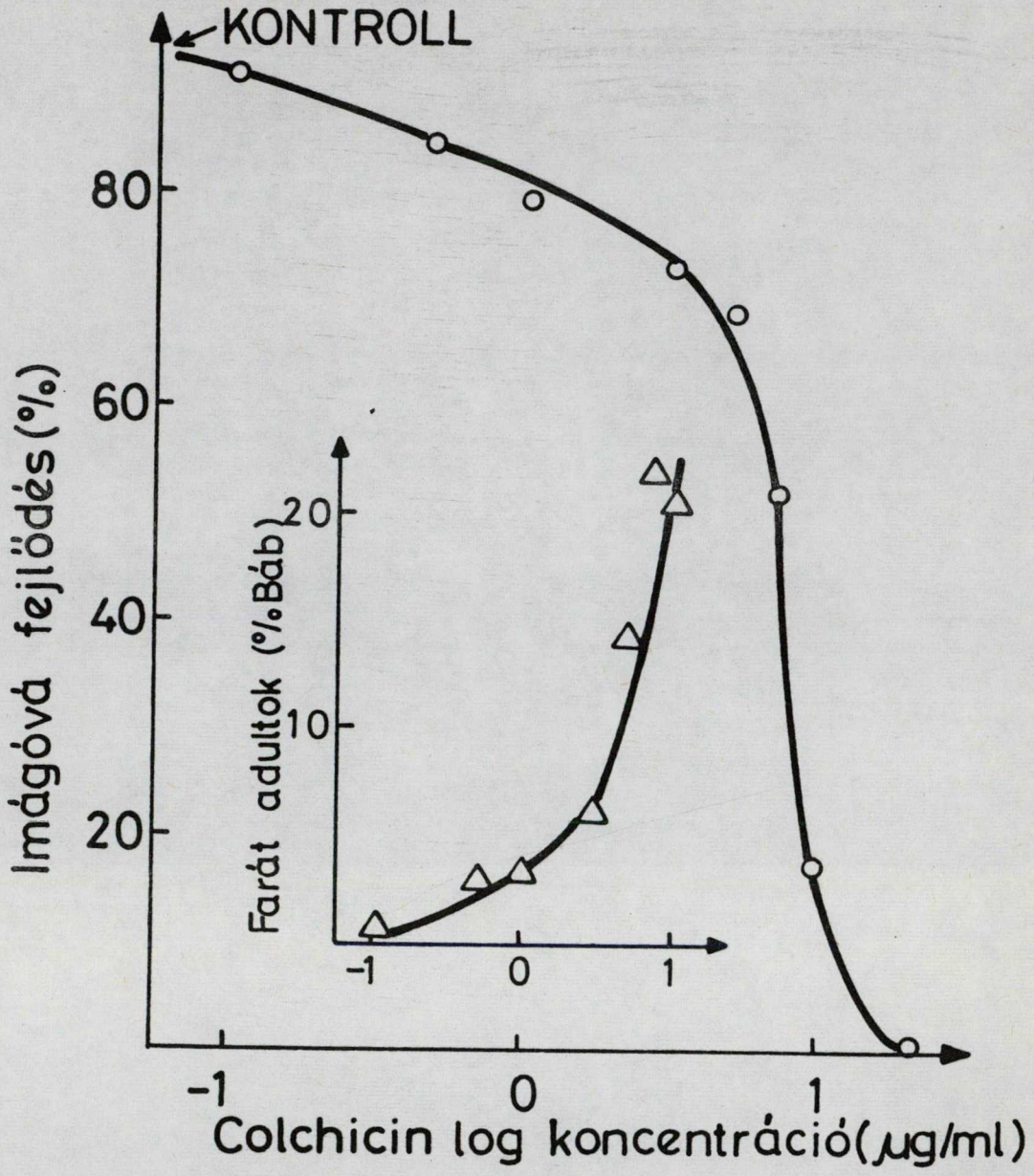
3. Eredmények

3. 1. A colchicin toxicitása

A colchicin koncentrációjának növekedésével a lárváknak a fejlődése a kontrollhoz képest kissé elhuzódott /pl. a 10 µg/ml-es koncentrációnál mintegy 1-1,5 nappal/. Magasabb /20; 50 µg/ml/ koncentrációknál a lárvák fejlődése leállt és két-három nap mulva elpusztultak. Azt is megfigyeltük, hogy sok lárva, bár bebábozódott, mint un. farát adult pusztult el röviddel azelőtt, hogy elhagyta volna a bábot. Kb. 100 felboncolt farát adulton semmilyen látható rendellenességet nem észleltünk /rendellenesen fejlett végtagok, a kutikula képződés hiányosságai stb./. A farát adultok gyakorisága növekedett a colchicin koncentrációjának növekedtével /7. ábra/. Néhány fiatalabb lárva anélkül bábozódott be, hogy táplálkozott volna a magas colchicin tartalmu táptalajjal. Belőlük un. mini bábok képződtek és ezeknémelyikéből mini adultok keltek ki: testük mérete a szokásosnak csupán 1/4 - 1/3-át tette ki. Mini adultok 7 és 10 µg/ml colchicin koncentrációnál fejlődtek és ezeket a szem és a szárny mozaikosságának vizsgálatakor nem vettük figyelembe.

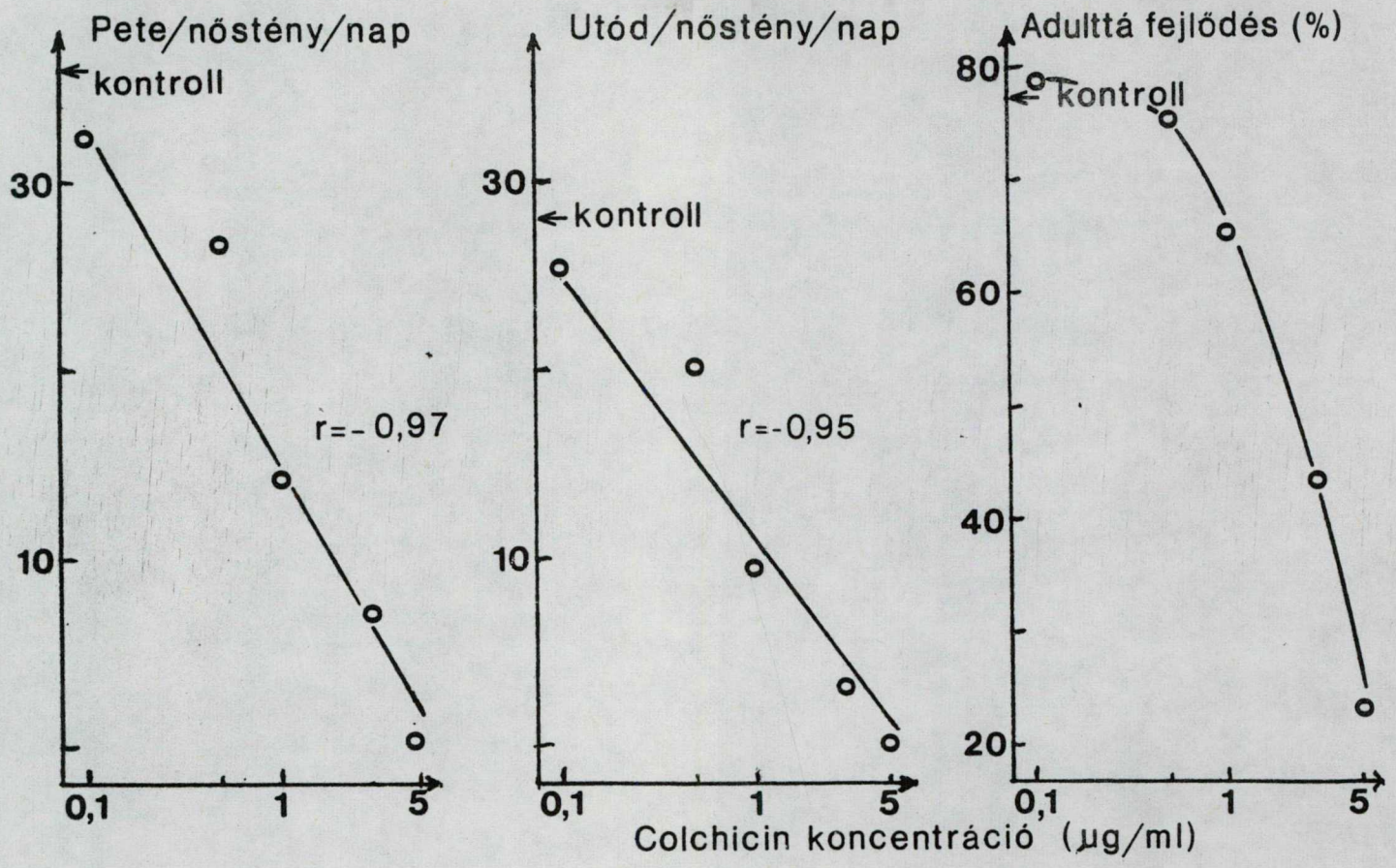
Megfigyeltük, hogy a colchicinnel kezelt lárvákból kifejlődő nöstények petetermelése a kontrolltól lényegesen elmaradt, a petéknek pedig egyre kisebb hányada fejlődött imágóvá /8. ábra/. A kontrollban a peték 77 %-a fejlődött imágóvá az 5 µg/ml colchicin koncentrációnál pedig csupán 23 %. A kontroll esetében sem várható, hogy minden petéből adult származzon, hiszen a nőstények és a testvér himek is heterozigóták a TM2 bālanszer kromoszómára /3. táblázat/, és emiatt a második generá-

József Attila Tudományegyetem Könyvtára SZEGED



7.ábra: A colchicin toxicitására vonatkozó eredmények ábrázolása

cióban a TM2/TM2 genotipusu embriók /az utódok 25 %-a/ elpusztulnak. Ugy tünik, hogy a logaritmikus colchicin koncentráció és a petetermelés, valamint a kezelt nősténytől származó utódok száma közötti kapcsolat lineáris /r=-0,97 ill. r=-0,95; 8. ábra/.



8. ábra: A pete- és utódhozam valamint a petéknek imágóvá fejlődésének függése a colchicin koncentrációjától olyan nőstények esetében, amelyek colchicint tartalmazó táptalajt fogyasztó lárvákból fejlődtek

Az imágók colchicin oldattal történő injekciója után a fiatalon és az ötnapos korukban injektált nőstények eltérően viselkedtek. A fiatalon /< mint egynapos/, 20 µg/ml-nél nagyobb koncentrációju colchicinnel kezelt nőstények paralizálódtak és rövidesen elpusztultak. Petéket nem raktak. Alacsonyabb colchicin koncentrációknál a nőstények egy része tulélte a kezelést és pár nap mulva néhány petét rakott. A peték egy részéből imágók is fejlődtek. Összességében azonban a colchicin oldattal injektált fiatal nőstények petetermelése a kontrolltól messze elmaradt. Az ötnapos nőstények a colchicin injekciót jól türték és még az 500 µg/ml koncentrációju oldat injekciója után is élt kb. 30 %-uk egy hetet. Ezek a nőstények kifejlett petéjüket lerakták, de a kevésbé fejletteket nem. A lerakott peteknek kevesebb mint 1 %-ából fejlődtek utódok. Kisebb colchicin koncentrációknál /50; 20; 10 és 5 µg/ml/ a nőstények élettartama csaknem a kontrolléval volt azonos és az imágók, bár csökkent mértékben, petéztek is. A peték nagy részéből utődok fejlődtek.

A colchicin toxikus hatását - nőstény imágókra - az jelzi, hogy az injekciót követően a petetermelő képességük lecsökkent és nagyjából állandó értéken maradt az injekciót követő három hét folyamán. A petéknek csak egy részéből fejlődtek utódok /10. táblázat/.

3. 2. Mozaikosság vizsgálatok

A mozaikosság vizsgálatával arra a kérdésre reméltünk választ kapni, hogy képződnek-e a colchicin kezelés után a kontroll szintjét szignifikánsan meghaladó gyakorisággal mozaik fol-

10. táblázat: A petetermelés és a petéknek utóddá fejlődése 0,2 µg colchicin oldat ötnapos nőstényekbe történő injekciója után

Colchicin koncentráció /ug/ml/	Pete/nap/nőstény Átlag ± szórás	Utód/nap/nőstény Átlag ± szórás	Adulttá fejlődés Átlag ± szórás	n
Kontroll	36,0 ± 7,0	27,9 ± 5,4	0,77 ± 0,10	4
10	13,4 ± 8,3	6,9 ± 5,5	0,52 ± 0,13	18
20	2,2 ± 1,7	0,8 ± 0,6	0,35 ± 0,16	29

tok a szemekben illetve a szárnyakon /lásd a 2.,3. és 4. ábrákat/. Emelkedett szintü mozaikosság jelezhetné, hogy a mozaik foltok némelyike a testi sejtek osztódása, a mitózisok folyamán bekövetkező un. szomatikus nondiszjunkció /esetleg kromoszóma elimináció/ következtében alakulhatott ki. Azoknak az imágóknak a szemét illetve szárnyát vizsgáltuk, amelyek colchicint tartalmazó táptalajt fogyasztó lárvákból fejlődtek.

A 7 µg/ml colchicinnel folytatott kezelés után az imágók szemében és szárnyán a kontrolltól szignifikánsan nem különböző gyakorisággal képződtek mozaik foltok /$P > 0,05$; 11. és 12. táblázatok/. A mozaik foltok mérete és indukciójának gyakorisága is arra utal, hogy a colchicin nem indukál mozaik foltokat a testi sejtekben. Ugyanakkor az ismert mutagének /EMS=etilmetánszulfonát és a röntgensugárzás/ nagy gyakorisággal indukált mozaik foltokat mind a szemekben mind a szárnyakon.

Az ivarsejt-vonal mozaikosságára vonatkozó eredményeket a 13. táblázatban foglaltuk össze. A colchicin kezelést követően megfigyeltük, hogy voltak mozaik nőstények is: ezektől normális alaku és K10 peték is származtak. A mozaik nőstények és a K10 peték gyakorisága szignifikánsan különbözött a kontrolltól, bár az 5 µg/ml colchicin koncentráció esetében csak kevés nőstényt vizsgálhattunk kielégitően /a colchicin okozta sterilitás miatt/. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a colchicin képes mozaikosságot indukálni az ivarsejt-vonalban, mig testi sejtekben nem.

11. táblázat: A szemek mozaikosságára vonatkozó eredmények

Kezelés	Vizsgált szem	Mozaik folt	A mozaikosság gyakorisága	Mozaik folt w/w^{co}	w	w^{co}	Foltméret /átlag és szórás/	A foltindukció gyakorisága*
Kontroll	2828	20	0,007	10	8	2	11,4 ± 6,2	$1,0 \times 10^{-4}$
Colchicin 7 ug/ml	1726	16	0,009	9	3	4	9,9 ± 5,2	$1,1 \times 10^{-4}$
EMS 0,3 mg/ml 4 órán át	194	28	0,144	10	8	10	12,1 ± 6,6	$28,1 \times 10^{-4}$
Röntgen-sugárzás 1000 R	130	93	0,715	53	20	20	27,4 ± 39,3	$245,3 \times 10^{-4}$

* : Arányszám, amely azt mutatja, hogy a szemkezdemény sejtek hányad részében indukálódtak mozaik foltok: $f=n\,m/N\,C$, ahol n a mozaik foltok száma N vizsgált szemben, m az átlagos ikerfolt méret, C a kifejlett szervet alkotó ommatidiumok száma. $C=800$/szem /Szabad és munkatársai, 1983/

12. táblázat: A szárnyak mozaikosságára vonatkozó eredmények

Kezelés	Vizsgált szárny	mwh mozaik folt	A mozaikosság gyakorisága	Mozaik folt mwh/flr^3	Mozaik folt mwh	Mozaik folt flr^3	Foltméret /átlag és szórás/	A foltindukció gyakorisága*
Kontroll	40	31	0,78	1	30	1	2,5 ± 1,4	6,2 x10^{-5}
Colchicin 7 ug/ml	40	27	0,68	2	25	0	3,4 ± 1,7	7,5 x10^{-5}
EMS 1,0 mg/ml 4 órán át	18	179	9,94	38	141	17	7,0 ± 2,5	225,6 x10^{-5}

* : Arányszám, amely azt mutatja, hogy a szárnykezdemény sejtek hányad részében indukálódtak mozaik foltok: f=n m/N C, ahol n a mozaik foltok száma N vizsgált szárnyon, m az átlagos ikerfolt méret, C a kifejlett szervet alkotó sejtek száma. C=30800/szárny /Szabad és munkatársai, 1983/.

13. táblázat: Az ivarsejt-vonal mozaikosságára vonatkozó eredmények

Kezelés	Nőstények			Peték		
	vizsgált	mozaik	%	összes	Kl0	%
Kontroll[a]	284	2	0,70	114700	15	0,013
Colchicin 3 ug/ml	44	3	6,82*	3487	12	0,344**
Colchicin 5 ug/ml	30	2	6,67	357	2	0,560*
EMS 0,3 mg/ml 4 órán át	63	7	11,11**	20809	24	0,115**

a, Wieschaus és Szabad /1979/ dolgozatából
* és ** : a kontrolltól $P \leq 0,05$ és $P \leq 0,01$ szinten különbözik

3. 3. Nondiszjunkció

3. 3. 1. Nondiszjunkció a kontrollban

A spontán nondiszjunkció gyakoriságát hét kisérletsorozatban határoztuk meg. A nőstények egy részét 3-5 nőstényből álló csoportokban, egy másik részét egyenként vizsgáltuk 7-30 napon át. Az eredményeket a 14. táblázat foglalja magába. A kontrollban átlagosan 0,086 %-os gyakorisággal képződtek nondiszjunkcióból származó egyedek, és az egyes sorozatok közötti szórás kicsiny volt: a nondiszjunkciós utódok gyakorisága szignifikánsan nem különbözött a hét sorozat között /$P \gg 0,01$/.

Érdekes, hogy - feltételezve, hogy nondiszjunkció ugyanolyan gyakorisággal következik be a nőstényekben és a himekben, valamint az első és a második meiotikus osztódás során - az egyes, nondiszjunkciót jelző fenotipusok az elméletileg várhatótól /6. táblázat/ nem különböző gyakorisággal jelentek meg /14. táblázat utolsó két oszlopa; $\chi^2=0,66$; $0,9 > P > 0,5$/. Ez az eredmény nem mond ellent annak a feltételezésnek, hogy a nondiszjunkció a Drosophila nőstényekben a meiozis redukciós és ekvációs osztódásaiban ugyanolyan gyakorisággal következik be.

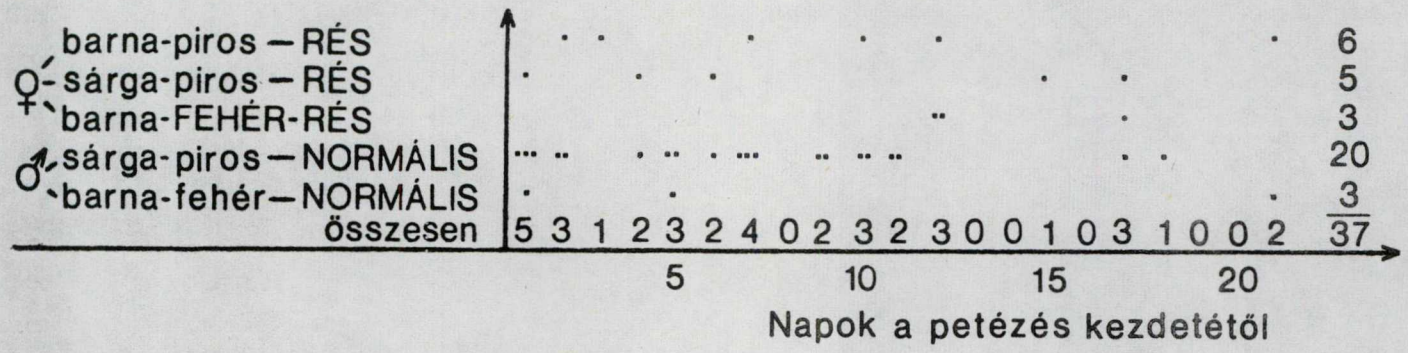
Feljegyeztük, hogy a petézés kezdetét követő hányadik napon lerakott petékből fejlődtek a nondiszjunkciót jelző utódok. Az eredményeket a 9. ábra mutatja és arra enged következtetni, hogy nondiszjunkció a petetermelés bármely szakaszában bekövetkezhet. A 256 F_1 nőstény közül 60 pete - és utódhozamát egyenként vizsgáltuk. A 60 nősténytől 9 nondiszjunkciót jelző utód származott. Mindegyikük más-más nősténytől. Vagyis nem teljesült az a reményünk, hogy egy nőstény utódai között egyetlen nondiszjunkció két termékét detektáljuk.

14. táblázat: Nondiszjunkció a kontrollban

Kisérlet	U T Ó D O K							Petéző nőstény
	Összes	Nondiszjunkcióból származók						
		Nőstények			Himek			
		barna piros RÉS	sárga piros RÉS	barna FEHÉR RÉS	sárga piros NORMÁLIS	barna fehér NORMÁLIS	Összes	%
A	8484	2	0	2	4	1	9	0,106	64
B	2631	0	0	0	2	1	3	0,114	13
C	7013	3	0	1	3	0	7	0,100	56
D	2583	1	2	0	1	1	5	0,193	11
E	3754	0	1	0	4	1	6	0,160	28
F	19853	1	1	0	4	3	9	0,045	60
G	8282	2	0	0	4	0	6	0,072	24
Összesen	52600	9	4	3	22	7	45	0,086	256
Várhatóan[a]		9,3	6,6	2,8	18,8	7,5	45		

a, feltételezve, hogy a nondiszjunkció egyforma gyakorisággal következik be nőstényekben és himekben, az első és a második meiotikus osztódások folyamán

Megjegyzés: Az F sorozat nőstényeit egyenként, a többiekét csoportokban vizsgáltuk.



9. ábra: Az aneuploid utódok megjelenése az idő függvényében a kontrollban

Megvizsgáltuk, hogy az aneuploid F_2 nőstényektől a másodlagos nondiszjunkció során milyen utódok származtak. Az eredményeket a 15. táblázat mutatja be. /Annak az 5 $\chi X\ B^sY$ nősténynek az utódait vettük figyelembe, amelyek χy^+Y himekkel párosodtak./ Érdekes, hogy χB^sY himet csupán egyet figyeltünk meg az utódok között. Pedig ha a meiozis folyamán az χ,X és a B^sY kromoszómák véletlenszerüen kerülnének a leánysejtekbe az első meiotikus osztódás végén /χ és $X\ B^sY$; χB^sY és X; χX és B^sY/ azt várnánk, hogy az összes utód tizede, harminc utód legyen χB^sY /lásd a 9. táblázatot is/. A tapasztalati és a várható adatok közötti eltérés arra utal, hogy az első meiotikus osztódás végén többnyire az χ és X kromoszómák más-más leánysejtbe jutnak, a B^sY kromoszóma pedig hol az egyik hol a másik leánysejtbe kerül. Az utódok várható és megfigyelt gyakoriságai közötti különbség szignifikáns /$P < 0{,}01$; de $P > 0{,}001$/. Ez a különbség annak tudható be, hogy a két Y kromoszómát hordozó him utódok csökkent életképességüek.

3. 3. 2. Nondiszjunkció a lárvák kezelése után

Ebben a kisérletsorozatban azt vizsgáltuk, hogy kimutatható-e a colchicin nondiszjunkciót okozó hatása a lárvális gonádokban. Azoknak a nőstényeknek az utódait vizsgáltuk, amelyek colchicint tartalmazó táptalajt fogyasztó lárvákból fejlődtek, miután a testvér himekkel párosodtak /lásd a 4. táblázatot/. A nőstényeket 3-10 tagu csoportokban petéztettük. A kisérlet eredményeit a 16. táblázatban foglaltuk össze.

A colchicin kezelés nyomán a nondiszjunkció bekövetkeztét jelző utódok gyakorisága a kontrollhoz képest szignifikánsan

15. táblázat. A XXB^sY aneuploid nőstények utódainak eloszlása Xy^+Y himekkel történő párosodás után

Az aneuploid nőstény ivarsejtjei	Az utódok típusa	száma megfigyelt[b]	várható
X	XX	53	37,1
X	Xy^+Y	52	37,1
XB^sY	XXB^sY	37	37,1
XB^sY	$X\ B^sYy^+Y$	26	37,1
X	XX	26[a]	37,1
X	Xy^+Y	35	37,1
XB^sY	XXB^sY	42	37,1
XB^sY	$X\ B^sYy^+Y$	26	37,1
X	XXX	0	
X	XXy^+Y	26[a]	
B^sY	$X\ B^sY$	1	
B^sY	B^sYy^+Y	0	

a, nem megkülönböztethetők

b, öt nőstény utódai

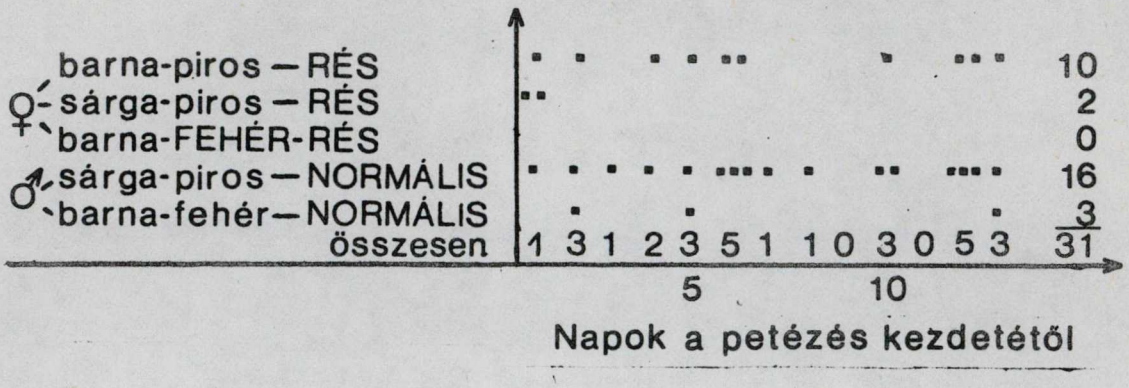
emelkedett /$P > 0,05$/ amennyiben a colchicin koncentrációja az 1 µg/ml-t meghaladta. A nondiszjunkció következtében csak az $XX\ B^sY$ nőstények és az XO himek számában következett be növekedés /16. táblázat utolsó sora; $P < 0,001$; χ^2 próba/. E megfigyelés lehetséges magyarázatára az eredmények értékelésénél térünk ki.

Az aneuploid utódok a petézés kezdetétől számitva véletlenszerüen jelentek meg, a petézés időtartama alatt közel azonos gyakorisággal /lo. ábra/.

16. táblázat: A colchicin nondiszjunkciót kiváltó hatása a lárvák kezelése után

Colchicin koncentráció /ug/ml/	U T Ó D O K								Petéző nőstény
	Összes	Nondiszjunkcióból származók							
		Nőstények			Hímek				
		barna piros RÉS	sárga piros RÉS	barna FEHÉR RÉS	sárga piros NORMÁLIS	barna fehér NORMÁLIS	Összes	%	
Kontroll	52600	9	4	3	22	7	45	0,086	256
0,1	5073	1	0	0	3	0	4	0,079	34
0,5	5290	1	2	0	1	1	5	0,094	39
1,0	4141	4	0	0	6	0	10	0,241**	52
3,0	1942	4	0	0	4	2	10	0,512***	111
5,0	228	0	0	0	2	0	2	0,870*	75
Összesen	16674	10 /2,9/	2 /1,3/	0 /1,0/	16 /7,0/	3 /2,2/	31 /14,3/		

Megjegyzés: zárójelben a kontroll gyakoriság alapján várható értékek
*, ** és *** = $P < 0,05$; $< 0,01$ és $< 0,001$



10. ábra: A különböző fenotipusu aneuploid utódok megjelenése az idő függvényében. A szülők olyan lárvákból fejlődtek, amelyek colchicint tartalmazó táptalajjal táplálkoztak

3. 3. 3. Nondiszjunkció nőstények colchicin-oldattal történő injekciója után

Ezekben a kisérletekben azt vizsgáltuk, hogy indukál-e a colchicin nondiszjunkdiót adult nőstényekben. A nőstények abdomenjébe injektáltunk colchicin oldatot, majd ezeket nem kezelt testvér himekkel kereszteztük. Az eredményeket a 17. táblázat mutatja be. Mig az 5 µg/ml colchicin hatására jelentősen nem emelkedett a nondiszjunkció gyakorisága, addig a 10 és 20 µg/ml colchicint tartalmazó oldat injekciója után szignifikáns mértékü növekedést figyeltünk meg a nondiszjunkciós utódok relativ gyakoriságában. Az aneuploid utódok közül a barna testü, piros szemszinü és RÉS szemalaku, a sárga testü piros és RÉS-szemü nőstények, valamint a sárga testü, piros szemszinü és

17. táblázat. A colchicin nondiszjunkciót okozó hatása adult nőstények kezelése után

Colchicin koncentráció (µg/ml)	UTÓDOK Összes	Nondiszjunkcióból származók Nőstények barna piros RÉS	sárga piros RÉS	barna FEHÉR RÉS	Hímek sárga piros NORMÁLIS	barna fehér NORMÁLIS	Összes	%	Petéző nőstény
Kontroll	52.600	9	4	3	22	7	45	0,086	256
5	2.537	2	0	1	0	0	3	0,118	41^a
10	3.618	9(0,6)	7(0,3)	0(0,2)	11(1,5)	2(0,5)	29	0,802***	67^a
20	2.223	17(0,4)	5(0,2)	0(0,1)	15(0,9)	0(0,3)	37	1,666***	26^a+28^b

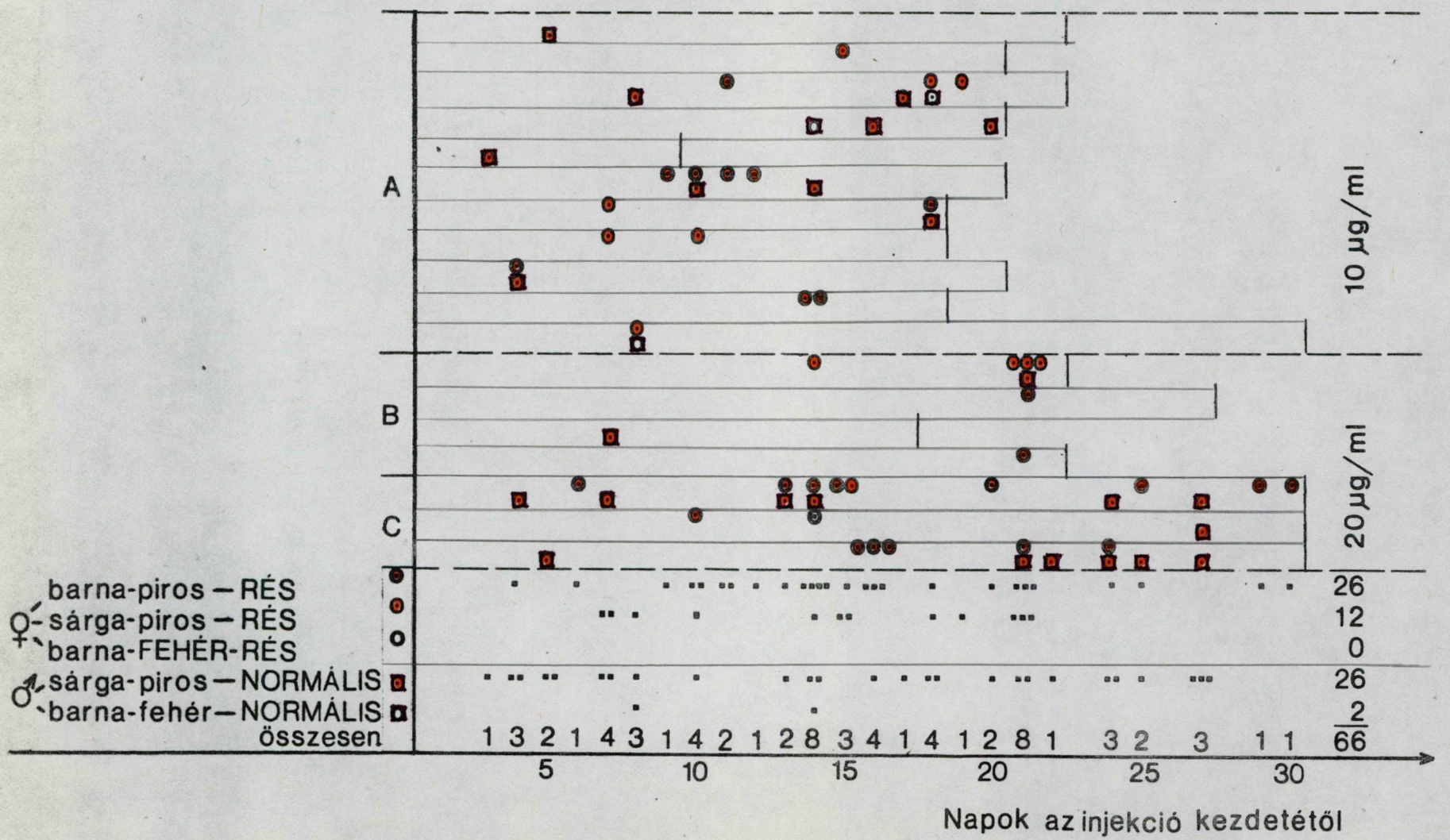
Megjegyzés: zárójelben a kontroll gyakoriság alapján várható értékek.
*** = P< 0,001. a = a nőstények egyenként, és b = csoportokban vizsgálva.

NORMÁLIS szemalaku himek száma haladta meg jelentősen a kontroll gyakoriság alapján várható értékeket /17. táblázat/. Az ilyen fenotipusu utódok azt jelzik, hogy colchicin a meiozis redukciós és ekvációs osztódásaiban egyaránt képes nondiszjunkciót kiváltani /lásd az 5. táblázatot is/.

Az aneuploid utódok közül a barna testü, piros és RÉS-szemü nőstények azokból a petékből fejlődtek, amelyeket az F_1 nőstények főleg az injekciót követő 9-10. napoktól raktak /11.ábra/. Ezek az aneuploid nőstények a meiozis redukciós sejtosztódásában bekövetkezett nondiszjunkcióból származnak /5. táblázat/. Az ekvációs osztódásból származó sárga testü, piros és RÉS-szemü nőstények a 7. naptól kezdődően jelentek meg. Sárga testü XO himek pedig az injekciót követően a 3. naptól kezdődően folyamatosan képződtek a lerakott petékből. Érdekes, hogy sárga testü, fehér és RÉS-szemü nőstények nem származtak a colchicinnel injektált nőstényektől.

A 10 µg/ml colchicin injekció nyomán a 41 vizsgált nőstény közül 11-től /26,8 %/ származtak aneuploid utódok /11. ábra/, összesen 29. A 20 µg/ml colchicin injekciót követően a nőstények egy részét egyenként, egy másikat pedig 3 csoportban vizsgáltuk /11. ábra/. A 28 egyenként vizsgált nőstény közül 4 /14,2 %/ adott 8 aneuploid utódnak életet. A 26, csoportban vizsgált nősténytől 30 aneuploid utód származott. Az A és a B csoportokban /11. ábra/ a 15, egyenként vizsgált és aneuploid utódoknak életet adó nőstény közül 5-ben lehetett egyetlen nondiszjunkció két termékét azonositani: a 11. ábrán felülről lefelé a 3., 6., 7., 9. és 12. nőstényekben, azokban, amelyek

11. ábra: Az aneuploid utódok megjelenése ötnapos nőstények colchicin oldattal történő injekcióját követően. Az A és B csoportokba tartozó nőstényeket egyenként, a C-be tartozókat 9, 8 és 9 nőstényből álló csoportokban vizsgáltuk



mindegyikétől származott NORMÁLIS szemü sárga testü him és RÉS-szemü nőstény /barna vagy sárga testü/. Az 5 nőstényben hét nondiszjunkciós esemény bekövetkeztére következtettünk: redukciós nondiszjunkcióra öt esetben, a 3.,a 6.,a 7. és a 9. nőstényekben /a 6.-ban esetleg kettőre/, a két ekvációsra a 3. és a 12. nőstényekben.

A colchicin injekciót követően képződő néhány aneuploid nőstény utódait is megvizsgáltuk. Azt vizsgáltuk, hogy az X és Y kromoszómák szegregációja a kontrollra /15. táblázat/ jellemzően alakul-e, vagy pedig attól eltérően. Az X és X kromoszómák esetleges kapcsolódása /a colchicin kezelés következtében/ várhatóan azt eredményezné, hogy a kontrollban megfigyelttől eltérő arányban képződnének a különböző fenotipusu utódok. Az eredményeket a 18. táblázat foglalja össze és azt jelzi, hogy a megvizsgált XX $B^{S}Y$ aneuploid nőstények utódainak megoszlása döntően a kontrollra jellemzően alakult.

18. táblázat A XXB^sY adult nőstények colchicin injekciója után képződött aneuploid nőstények utódainak eloszlása Xy^+Y himekkel történő párosodás után

Az aneuploid nőstény ivarsejtjei	Az utódok tipusa	Az utódok száma megfigyelt[b]	Az utódok száma várható
X	XX	18	16,4
X	Xy^+Y	14	16,4
XB^sY	XXB^sY	34	16,4
XB^sY	$X\ B^sYy^+Y$	18	16,4
X	XX	19[a]	16,4
X	Xy^+Y	11	16,4
XB^sY	XXB^sY	6	16,4
XB^sY	$X\ B^sYy^+Y$	11	16,4
XX	XXX	0	
XX	XXy^+Y	19[a]	
B^sY	$X\ B^sY$	2	
B^sY	B^sYy^+Y	0	

a, nem megkülönböztethetők

b, öt nőstény utódai

4. Az eredmények értékelése

A doktori értekezés egy olyan módszer elvi alapjait irja le, amely lehetővé teszi az X kromoszóma-szám változásának kimutatását Drosophila melanogasterrel egy két generációs tesztben. Az első, F_1 generációbeli utódokat /lárvákat vagy imágókat/ tesszük ki a kérdéses hatásnak és a következő, F_2 generációban vizsgáljuk meg az imágókat. Az X kromoszóma nondiszjunkció vagy elimináció következtében ötféle olyan fenotipusu utód jelenhet meg, amelyek spontán csak ritkán figyelhetők meg /0,086 %-os gyakorisággal; 38. oldal/: az épszemü nőstények mellett RÉSszemüek, a résszemü fiuk mellett pedig NORMÁLIS szemalakuak /17. oldal/. Az ötféle "rendkivüli" fenotipusu utód az ivarsejt vonalban bekövetkező, aneuploidiát eredményező esemény következménye. A "rendkivüli" utódok fenotipusából a nondiszjunkció helyére is következtetni lehet, hogy t.i. az a meiozis első vagy második osztódásában következett-e be /5. táblázat, 17. oldal/. Feltételezve, hogy nondiszjunkció egyforma eséllyel következik be a meiozis redukciós és az ekvációs osztódásában /de figyelembe véve, hogy a redukciós nondiszjunkció csak egy, mig az ekvációs két sejtben következhet be, 5. ábra, 13. oldal/ megbecsülhető, hogy a "rendkivüli" fenotipusu utódok milyen gyakorisággal képződhetnek az F_2 generációban. Az eredményeink /14. táblázat, 38. oldal/ nem mondanak ellent annak a hipotézisnek, mely szerint a redukciós és ekvációs nondiszjunkció azonos gyakorisággal következik be a nőstényekben és himekben, az első és a második meiotikus osztódás folyamán, legalábbis a kontrollban.

4. 1. A nondiszjunkciós teszt érzékenysége

Valamely kezelés nondiszjunkciót okozó hatását az jelzi, hogy képződnek-e "rendkivüli" utódok a kezelés nyomán olyan gyakorisággal, amely a kontroll értékét szignifikánsan meghaladja /Kastenbaum és Bowman, 1970/. A teszt érzékenységének korlátait a kontroll gyakoriság és a levizsgálható utódok száma jelenti /Würgler és munkatársai 1977/: minél magasabb a spontán kontroll gyakoriság annál nagyobb számu utód levizsgálására van szükség, különösen csekély mértékü hatás kimutatására /19. táblázat/.

Tekintettel arra, hogy a kontroll szintje viszonylag alacsony, mintegy 0,1 %, a nondiszjunkció viszonylag csekély mértékü kimutatása is lehetséges: pl. kétszeres emelkedés kimutatásához 14000 F_2 utód vizsgálata elegendő, de a háromszoroséhoz már 5667 is /19. táblázat/. Ekkora minták tanulmányozása nem jelent különös akadályt.

A lárvák és az adultok colchicinnel történt kezelése után olyan méretü mintákat vizsgáltunk meg /16. és 17. táblázatok, 42. és 44. oldal/, amelyek alkalmasak voltak a kontroll szintjének mintegy 3-szoros emelkedésének kimutatására. Bizonyitottuk a colchicin ≥1 µg/ml-es koncentrációjának nondiszjunkciót okozó hatását a lárvák kezelése után. Nőstény imágók injekcióját követően a colchicin nondiszjunkciót okozó hatását a 10 µg/ml koncentrációjánál mutattuk ki. Ez a koncentráció nőstényenként 2 ng beinjektált colchicinnek felel meg, mivel egy nősténybe mintegy 0,2 µl oldatot injektáltunk be /27. oldal/. Minthogy egy nőstény tömege 1 mg, a colchicin dózisa 2 mg/kg testsulynak felel meg. A ≥ 20 µg/ml-es oldattal folytatott injekciók

19. táblázat: A megvizsgálandó minta nagysága a Kastenbaum és Bowman teszt alapján

Kisérleti gyakoriság	Kontroll gyakoriság		
	0,00	0,1	0,3
0,1	8000	-	-
0,15	5334	40667	-
0,2	4000	14000	-
0,25	3200	8000	-
0,3	2667	5667	-
0,4	2000	3250	26250
0,5	1600	2600	9200
0,6	1334	1834	4667
0,7	1143	1572	3286
0,8	1000	1250	2375

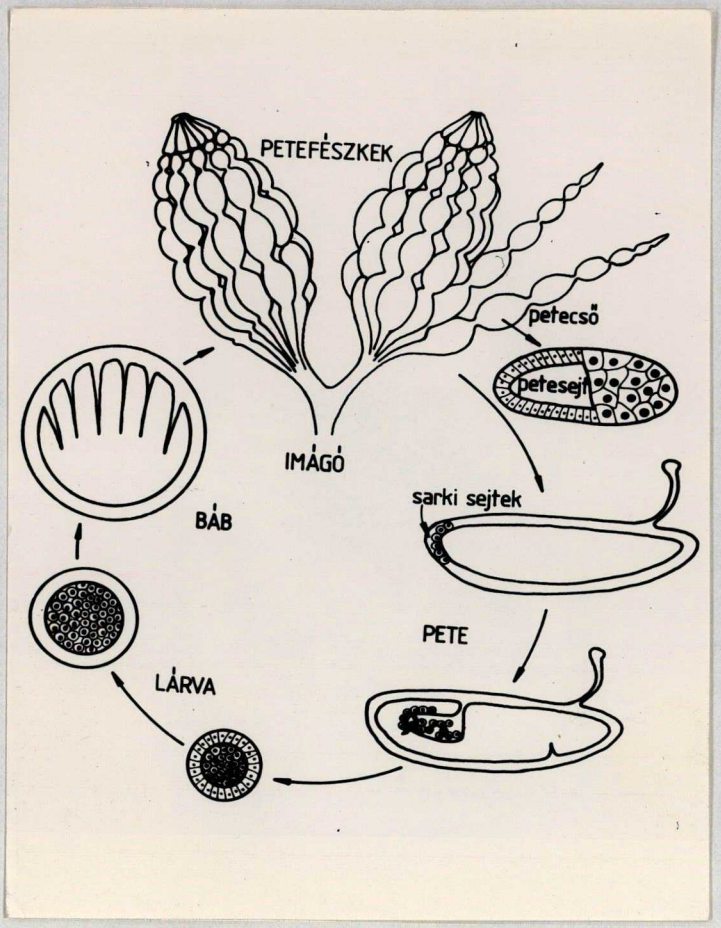
A táblázatban közölt adatok a minimálisan megvizsgálandó minta méretét jelentik, mely annak bizonyitásához szükséges, hogy a kisérleti gyakoriság a kontrolltól 95 %-os szinten különbözik /Würgler és mtsai, 1977, 368. oldal/.

József Attila Tudományegyetem Könyvtára SZEGED

toxikusak voltak: a nőstények petetermelése csökkent, a peték-nek csak kis része fejlődött lárvává majd imágóvá és a peték-nek növekvő hányada volt rendellenes alaku: a hátoldali függe-lékek megrövidültek, a peteburok /chorion/ csökevényes lett, sok volt az abortiv pete. Ez az eredmény azt jelzi, hogy a col-chicin gátolja a sejtek osztódását. A colchicin toxikus hatása irreverzibilis volt, szemben azzal amit Fábián /1947/ korábban leirt. A kifejlett nőstény imágókban a petefészek az egyetlen szerv, amelyben sejtosztódások játszódnak le. Ezért történhet meg, hogy a kifejlett nőstény imágók még 1000 µg/ml colchicin oldat injekciója után is hosszu ideig élnek - bár sterilek -, a fiatal imágók /≤ 1 naposak/ viszont a 10 µg/ml colchicin ol-dat injekciója után is elpusztulnak jelezve, hogy a fiatal imá-gók testi szöveteiben játszódnak le sejtosztódások. Ezt a je-lenséget a szakirodalomban eddig még nem irták le.

4.2. Nondiszjunkció a lárvák és az imágók kezelése nyomán

Egy kifejlett nőstény petefészkében többféle osztódó sejt figyelhető meg /12. ábra/. A petecső csucsában, a germárium-ban alakulnak ki a petekezdemények. A következő módon: Egy nős-tényben mintegy 100, differenciálatlan, mitotikusan osztódó ős-csirasejt van a germáriumok csucsában /Wieschaus és Szabad, 1979/. Ezek az oogoniális sejtek. Az oogoniális sejtek egyenlőtlenül osztódnak: egyik utódsejtjük differenciálatlan őscsirasejt ma-rad, a másikból az alábbiak szerint pete képződik. Előbb négy-szer osztódik mitotikusan, egy 16 sejtből álló képződményt al-kotva. A 16 sejt közül egyik az elsődleges oocita, a majdani petesejt, a további 15 pedig tápláló, dajkasejt. A 16-sejtes képződményt mezodermális eredetü un. follikuláris sejtek /kb.50/



12. ábra: A Drosophila nőstény ivarsejtvonalának kialakulása. Magyarázat a szövegben.

veszik körül. Igy alakul ki egy petekezdemény. A meiozis az elsődleges oocitában kezdődik /még fenn a germáriumban/, és a nőstényben az első meiotikus osztódás metafázisáig jut el. Ebben a stádiumban rakja le a nőstény petéit. A meiozis első osztódásának ana- és telofázisa valamint a második meiotikus osztódás a megtermékenyülés után játszódik le. A pete kialakulása az őscsiraejt osztódásától a pete lerakásáig mintegy 9-15 napot vesz igénybe 22°C-on és 25°C-on valószinüleg csupán 7-12-t. A petekezdemény kialakulása /a germáriumban/ mintegy 7 napig tart. A pete feltöltődése /szik és egyéb anyagokkal/, a pete-

burok a már majdnem érett peték körül alakul ki. A lárvális petefészket mitotikusan osztódó oogoniális sejtek alkotják /Wieschaus és Szabad, 1979/.

Az előzőek alapján tekinthetjük át, hogy milyen következménye lehet a colchicin nondiszjunkciót okozó hatásának a különböző stádiumu petekezdeményekre.

1. A már kialakult petekezdeményben /amelyben a petesejt az első meiotikus osztódás metafázisában van/ a colchicin indukálhat redukciós és ekvációs nondiszjunkciót is és ha képes bejutni a petébe, nondiszjunkciót akár már röviddel a pete lerakása után észlelhetünk /ugy, hogy ezekből a petékből aneuploid utódok fejlődnek/. Az első aneuploid utódok azokból a petékből fejlődtek, amelyeket a nőstények 3-5 nappal az injekció után raktak. Ez az eredmény arra enged következtetni, hogy a colchicin nem jut át a már kialakult peteburkon.

A közvetlenül a colchicin injekció után lerakott peteknek mégis csupán kis hányada fejlődött utóddá. Ezt a jelenséget fiziológiai hatással magyarázzuk /Szabad és Fajszi, 1983/. A colchicin injekció nyomán a nőstények a már érett petéknek csak egy részét képesek lerakni és ezeknek is csak kis hányadába spermiumot juttatni a testükben raktározott spermiumokból. A fiziológiai hatást az is jól jelzi, hogy ha ötnapos szüz nőstényeket injektáltunk colchicinnel /a már ismert dózissal/, azok nem párosodtak és tőlük egyetlen utód sem származott. Természetesen a Ringer oldattal injektált nőstények mindegyike párosodik és sok utódnak ad életet.

A colchicin azokban a petekezdeményekben indukálhatott nondiszjunkciót, amelyeket még nem borit burok. Ezeket a petéket

a nőstények az injekciót követő 3-5. naptól kezdődően rakták le. A petékből főleg XO himek képződtek /amelyek jelezhetnek redukciós és ekvációs nondiszjunkciót valamint kromoszóma eliminációt is/, de a redukciós nondiszjunkciót jelző két nőstényt /barna test, piros szinü és résalaku szem, 5. táblázat, 17. oldal/ is megfigyeltünk /11. ábra, 46. oldal/. Olyan nőstények, amelyek ekvációs nondiszjunkció bekövetkeztére utaltak volna nem képződtek.

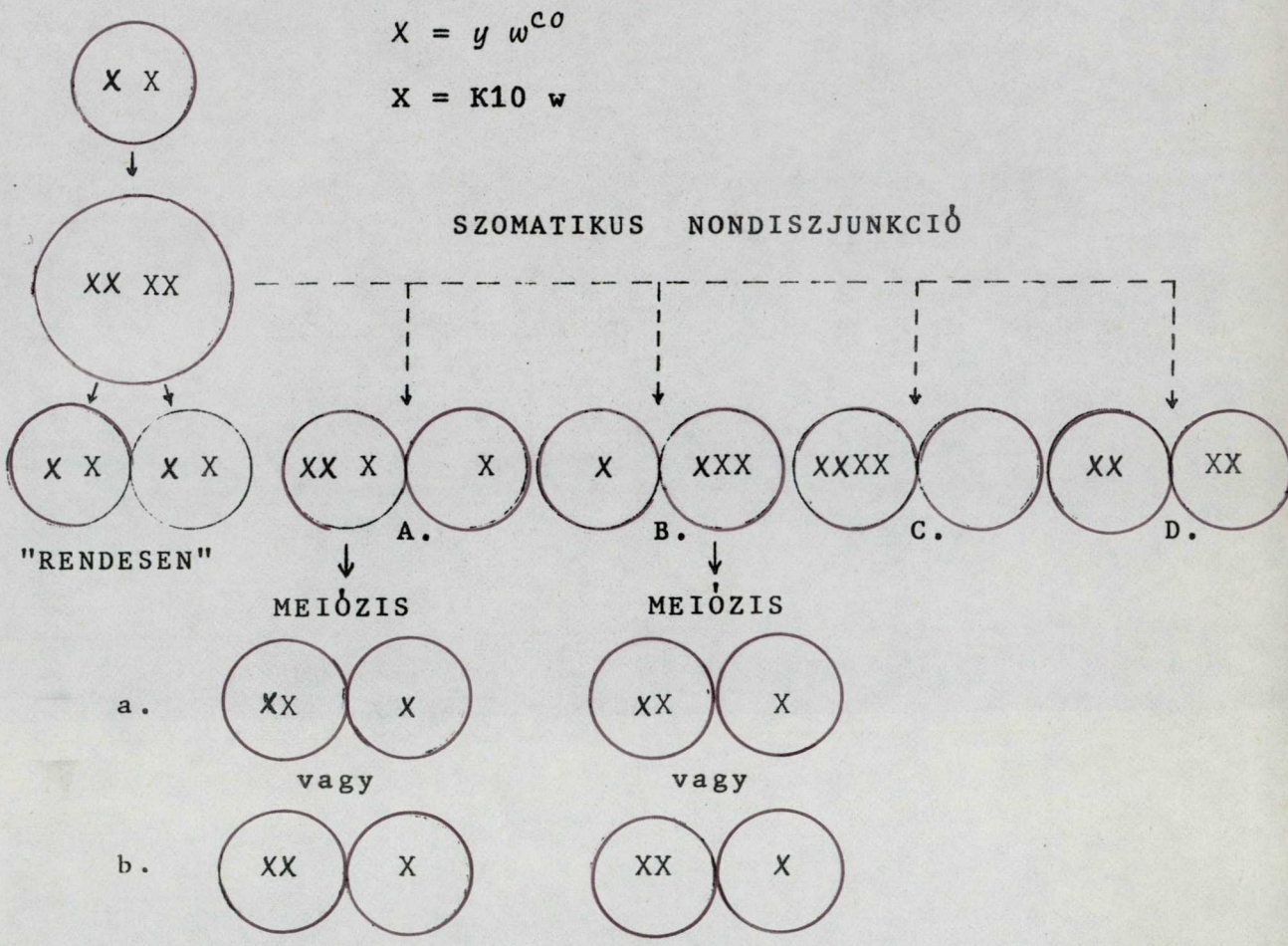
A már kialakult petekezdeményekben indukált nondiszjunkció esetében nem számithatunk arra, hogy egyetlen nondiszjunkciós esemény két aneuploid termékét - mint egy "ikerfoltot" - észleljük, hiszen a másodlagos oocita osztódása után /már a lerakott petében, a megtermékenyités után/ képződő négy mag közül három sarki test magként degenerálódik.

2. A differenciálatlan őscsirasejt egyenlőtlen osztódása után képződik egy sejt, amelyből pete képződik. Ez a sejt négy mitotikus osztódás után képezi azt a 16 sejtet, amelyek közül az egyik az elsődleges oocita. Nondiszjunkció - elvileg - a négy mitotikus osztódás során is bekövetkezhet. Ez az esemény - bár ivarsejt-vonal sejtekben játszódik le, mégis <u>szomatikus nondiszjunkció</u> - több következménnyel járhat /13. ábra/.

A. és B. : Az egyik leánysejt triszómiás a másik monoszómiás. Az Á. és B. lehetőséghez csupán egyetlen nondiszjunkcióra van szükség.

C.: Az egyik leánysejt 4 X kromoszómát hordoz, a másik egyet sem.

D.: Mindkét leánysejt 2-2 X kromoszómát hordoz, de - mint az első meiotikus osztódás után - az egyik az anyai, a másik az



13. ábra Szomatikus nondiszjunkció és következményei

apai eredetü homológokat. A C.,D. események bekövetkeztéhez két nondiszjunkció szükséges, ezért az ilyen tipusu események valószinütlenek. Az A. és B. események során képződő, 3 X kromoszómát hordozó sejtekből a meiozis után két illetve egy X kromoszómát hordozó peték képződnek. A 3 X kromoszómát hordozó ősivarsejtek kiváló életképességüek, belőlük utódok származhatnak /Schüpbach, Wieschaus és Nöthiger, 1978/, az XO sejtek valószinüleg elpusztulnak /Van Deusen, 1976/. Minthogy a szomatikus

nondiszjunkció egy kialakulóban levő petekezdeményen belül játszódik le nem várható, hogy egyetlen nondiszjunkció két eseményét - mintegy ikerfoltot - érzékeljük. Tovább bonyolitja a képet az a tény, hogy a négy mitózis bármelyikében lejátszódhat a szomatikus nondiszjunkció, mozeik petét hozva létre: olyat, amelyben a 16 sejtet különböző genetikai tartalmu sejtek alkotják. Az ilyen petekezdemények fejlődéséről semmit sem tudunk. A 16 ivarsejt-vonal eredetü sejtet un. gyürü csatornák kötik össze, a dajkasejtek politenizálódnak.

3. Szomatikus nondiszjunkció játszódhat le a colchicin kezelés nyomán az oogoniális sejtekben is: a nőstények petecsöveinek csucsában osztódó mintegy 100 őscsirasejtben és a lárvális petefészket alkotókban is. A szomatikus nondiszjunkció következményeit a 13. ábra mutatja. Az egy X kromoszómát hordozó sejtek valószinüleg elpusztulnak. Ha életképesek volnának XO és XO himeknek azonos gyakoriséggal kellene képződni hiszen az A. és B. események valószinüsége azonos /13. ábra/. Várakozásunknak az eredmények ellent mondanak: XO himeket 13-szor gyakrabban figyeltünk meg az adultok colchicin injekciója után mint XO-akat /17. táblázat, 44. oldal és 11. ábra, 46. oldal/.

Mint emlitettük, a 3 X kromoszómát hordozó ősivarsejtek életképesek, belőlük 2 X és X kromoszómát hordozó peték képződnek. Ha a 2 X kromoszómát hordozó petét B^sY kromoszómát hordozó spermium termékenyiti meg, aneuploid nőstény utód képződik, ugyan ugy mintha a meiozis során képződött volna a nondiszjunkció. Az egy X kromoszómát hordozó petékből nem származnak aneuploid utódok. Vagyis a 3 X kromoszómát hordozó sejtől csak aneuploid nőstény /XXB^sY/ utód képződésére számithatunk, XO himekére nem. És valóban, olyan nőstényeket megfi-

gyeltünk /7-et; 11. ábra, 46. oldal/ az egyenként petéztetettek között, amelyektől csak XXB^{s}Y nőstény aneuploid utódok származtak XO himek nem.

Egy XXX vagy egy XXX ősivarsejtből /szomatikus nondiszjunkció után/ várhatóan kétszer akkora gyakorisággal származnak XX kromoszómát hordozó peték mint XX-ek vagy X-ek /13. ábra, a és b lehetőségek/. A kisérleti eredmények alátámasztják várakozásunkat. A nőstény imágók injekcióját követően XX kromoszómát /és természetesen B^{s}Y-t is/ hordozó nőstényt 26-ot figyeltünk meg /11. ábra, 46. oldal/, XX-et hordozót pedig 12-t. Olyan nőstényt, amely X kromoszómát hordozott volna egyet sem. Ez az eredmény is érthető, hiszen az X, a K10 mutációra homozigóta sejtekből abnormális alaku peték /u.n. K10 peték, 6. ábra, 24. oldal/ fejlődnek. Az itt elmondottakat alátámasztják azok a megfigyelések, hogy a colchicin kezelés nyomán /13. táblázat, 36. oldal/ a nőstények a kontrollt meghaladó gyakorisággal raktak K10 petét.

Az imágókban kiváltott szomatikus nondiszjunkciónak jeleként az aneuploid nőstény utódok várhatóan csak az injekciót követő 7. naptól kezdődően jelennek meg. Ezt a várakozást pontosan fedik megfigyeléseink: az aneuploid nőstény utódok 95 %-át /36/38, 11. ábra/ a 7. naptól figyeltük meg.

A szomatikus nondiszjunkció - legalábbis az imágók esetében - egyenlőtlenül osztódó őscsirasejtben következik be. A 3 X kromoszómát hordozó életképes sejtből pete képződhet, vagy mint differenciálatlan őscsirasejt osztódik tovább /Wieschaus és Szabad, 1979/. A két lehetőség valószinüsége egyaránt 1/2 . Az előző esetben /feltételezve, hogy a nősténynek csak egyetlen

őscsirasejtjében következik be szomatikus nondiszjunkció/ a nősténytől csak egyetlen egy aneuploid nőstény utód származik. Ha a 3 X kromoszómát hordozó sejt mint differenciálatlan őscsirasejt osztódik tovább, a nősténytől több aneuploid nőstény utód is származik: 2:1 arányban XX és XX kromoszómákat hordozók, várhatóan lesz olyan is, amelytől csak X kromoszómát hordozók, ezek viszont K10 petéket is raknak /13. ábra B/b eset/. Amint azt a 11. ábra /46. oldal/ mutatja minden lehetőségre figyeltünk meg példákat. Felülről lefelé a 2., 9., 11., 13. és 15. /összesen 5/ nőstényektől 1-1 aneuploid nőstény utód származott: 3-tól XX, 2-től XX kromoszómát hordozók. A 3., 6., 7., 8., 10. és 12. /összesen 6 / nőstényektől egyenként több aneuploid nőstény utód származott; a 3. és a 7. XX és XX, a 6. és a 10. csak XX mig a 8. és a 12. csak XX kromoszómát hordozó aneuploid nőstény utódoknak adott életet.

A fentiek alátámasztani látszanak azt a megállapitásunkat, hogy az F_2 generációban megfigyelt aneuploid nőstény utódok döntő többsége az ősivarsejtekben indukált szomatikus nondiszjunkció következménye. A szomatikus nondiszjunkció következtében viszont nem várható XO himek képződése, hiszen az XO ősivarsejtek elpusztulnak. Az XO himek valószinüleg kromoszóma eliminácáó következtében jönnek létre. Érdekes, hogy XO himek a kisérlet kezdetétől a végéig közel azonos gyakorisággal képződtek /11. ábra, 46. oldal/. Nem tudjuk, hogy ez annak az oka, hogy a colchicin nem ürül ki a nőstények testéből, vagy bár kiürül, olyan "állapotot" hoz létre, amely kedvez a kromoszóma eliminációnak.

József Attila Tudományegyetem Központi Könyvtára SZEGED

4. 3. Nondiszjunkció a szomatikus sejtekben

Az F_1 nőstények ősivarsejtjeiben bekövetkező szomatikus típusu nondiszjunkciót az F_2 generációban tudtuk kimutatni. Amint azt a 13. A. és B. ábra mutatja, szomatikus nondiszjunkció következtében 3 X és XO leánysejtek jönnek létre. A 3 X kromoszómát hordozó sejtek /$\underline{w}^{co}/\underline{w}^{co}/\underline{w}$ és $\underline{w}^{co}/\underline{w}/\underline{w}$ / nem mutathatók ki a $\underline{w}^{co}/\underline{w}$ háttéren. Reméltük viszont, hogy az XO /$\underline{w}$ vagy $\underline{w}^{co}$ hemizigóta/ sejteket ki tudjuk mutatni azoknak a nőstényeknek a szemében, amelyek olyan lárvákból fejlődtek, melyek colchicin tartalmu táptalajt fogyasztottak. Várakozásunkat az igazolta volna, hogy a magányos fehér /$\underline{w}$/ illetve korall piros /$\underline{w}^{co}$/ mozaik foltok gyakorisága megemelkedett volna. Természetesen a mozaik foltok gyakorisága akkor is növekedett volna, ha a colchicin képes lenne mitotikus rekombinációt indukálni kromatidák törése révén.

Ez utóbbi hipotézist ellenőrzendő vizsgáltuk meg a szárnyak mozaikosságát /35. oldal/, mivel az a 3. kromoszómán bekövetkező eseményeket tükrözi. A 3. kromoszóma eliminációja is vezethetne mozaik foltok képződéséhez, de a nagy autoszóma eliminációja a sejt pusztulását okozza. Ezért a 3. kromoszóma alapján detektált mozaikosság kromoszóma törésre vezethető vissza. Mivel a szárnyak mozaikossága a colchicin kezelés után is a kontroll szinten maradt /12. táblázat, 35. oldal/ arra következtettünk, hogy a colchicin nem töri a kromatidákat és nem indukál ezen az uton mozaik foltokat.

Az eredmények /11. táblázat, 34. oldal/ nem jelezték, hogy a colchicin hatására a szemben növekedett volna a mozaik foltok gyakorisága. Ennek az az oka, hogy az XO sejtek elpusztulnak /Sanchez és Nöthiger, 1983/. Ha az XO állapot a blasztoderma stádium előtt alakul ki - mint pl. az XX//XO mozaikok, a gynanderek

esetében - az XO him sejtek az X kromoszómához kötött gének aktivitását annak a kétszeresére állitják be, mint ami az XX, nőstény sejtekre jellemző. Igy végeredményben az X kromoszómához kötött gének termékeinek koncentrációja a him és a nőstény sejtekben azonos; u.n. dóziskompenzáció. A dóziskompenzáció a blasztoderma stádium körül alakul ki és az egyedfejlődés későbbi szakaszában megváltoztathatatlan. Ha egy XX sejtből az egyik X kromoszóma eliminációja nyomán XO sejt képződik ugy az hamarosan elpusztul, mert az X kromoszómához kapcsolt gének termékei nincsenek jelen megfelelő koncentrációban. Ez a megállapitás azt is jelenti, hogy azt a lehetőséget miszerint a mozaik foltok egy része szomatikus nondiszjunkció következtében képződik el kell vetnünk. Természetesen a kettős szomatikus nondiszjunkciók szerepéről továbbra sem feledkezhetünk meg /13. ábra D./, ennek szerepe azonban valószinüleg elhanyagolható.

Az itt elmondottak jelzik, hogy az általunk kidolgozott rendszer testi sejtekben bekövetkező nondiszjunkció kimutatására nem alkalmas. Erre a célra más, a 4. kromoszóma és a hozzá kapcsolódó marker mutációk használata tünik alkalmasnak. Tudunk viszont nondiszjunkciót kimutatni az ivarssejt-vonalban és azt gondoljuk, ennek jelentősége sem elhanyagolható.

5. Irodalom

De Bertoldi, M. and Griselli, M. and Barale, R.: Different test systems in Aspergillus nidulans for the evaluation of mitotic gene conversion, crossing-over and nondisjunction. Mutat. Res. 74, 303-324, 1980.

Fábián Gy.: Effects of colchicine injected in female Drosophila. Ann. Tihany Hung. Biol. Kut. Int. 17, 157-162, 1947.

Igali Sándor: Környezeti mutagenezis. A biológia aktuális problémái. 11. kötet, 143-237, Medicina, Budapest, 1977.

Kastenbaum, M. A. and Bowman, K. O.: Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. Mutation Research 9, 527-549, 1970.

Sanchez, L. and Nöthiger, R.: Sex determination and dosage compensation in Drosophila melanogaster: production of male clones in XX females. The EMBO Journal 2, 485-491, 1983.

Schüpbach, T., Wieschaus, E. and Nöthiger, R.: A study of the female germ line in mosaics of Drosophila. Wilhelm Roux's Archives 184, 41-56, 1978.

Sutton, H.L.: An Introduction to Human Genetics. Saunders College, Philadelphia, 1-239, 1980.

Szabad János: A mutációk molekuláris mechanizmusa. A géntől a genomig I. Jegyzet. Genetikai Iskola '84. Közlés alatt. Szerk: Szentesi István. O.K.I. Budapest, 1984.

Szabad, J. and Fajszi, Cs.: Control of female reproduction in Drosophila: genetic dissection using gynandromorphs. Genetics 100, 61-78, 1982.

Szabad, J., Soós, I., Polgár, Gy. and Héjja, Gy.: Testing the mutagenicity of malondialdehyde and formaldehyde by the

Drosophila mosaic and the sex-linked recessive lethal tests Mutation Research, 113, 117-133, 1983.

Van Deusen, E.B.: Sex determination in germ line chimaeras of Drosophila melanogaster. J. Embryol. Exp. Morphol. 37, 173-185, 1976.

Wieschaus, E. and J. Szabad: The development and function of the female germ line in Drosophila melanogaster, A cell lineage study, Develop. Biol. 68, 29-46, 1979.

Würgler, F.E., F.H. Sobels and E. Vogel: Drosophila as assay system for detecting genetic changes, in: Kilbey et al. /Eds./, Handbook of Mutagenicity Test Procedures, Elservier Biomedical, Amsterdam, pp. 335-373, 1977.