

Ritka genetikai variánsok tömeges visszanyerésére
alkalmas módszer és annak alkalmazása
a *Drosophila melanogaster* X-kromoszómájára

Doktori értekezés

Irta:

K o c z k a K a t a l i n

Magyar Tudományos Akadémia

Szegedi Biológiai Központ

Genetikai Intézet

S z e g e d

1 9 8 2.



Köszönettel tartozom Professzor Alföldi Lajosnak, az MTA Szegedi Biológiai Központ és a Genetikai Intézet igazgatójának a munkafeltételek biztosításáért és az erkölcsi támogatásért.

Hálával tartozom munkatársamnak, Kiss Istvánnak, aki bevezetett e témába, Belyaeva és munkatársainak, akikkel e téma keretében együttműködtünk.

Köszönetet mondok továbbá Dusha Bélának az illusztrációk gondos elkészítéséért, Rehák Anna asszisztensnek lelkiismeretes munkájáért.

TARTALOMJEGYZÉK

	Oldal
BEVEZETÉS	1.
IRODALMI ÁTTEKINTÉS	2.
ANYAG ÉS MÓDSZER	14.
1. <i>Drosophila</i> tenyészetek fenntartása	14.
2. Letális mutánsok	14.
3. Komplementációs vizsgálatok	15.
4. Genetikai térképezés	16.
5. Tömegtenyésztés	17.
6. Tömegszelekció	20.
EREDMÉNYEK	24.
1. Komplementációs kísérletek	24.
2. Az $\ell(1)npr-2$ pontos helyének megállapítása az X-kromoszóma térképén	28.
3. A letális mutációk helyzetének és egymás közötti távolságának meghatározása az X-kromoszómán	33.
4. Duplikáció izolálása	44.
AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA	53.
IRODALOMJEGYZÉK	59.
FÜGGELÉK	62.

BEVEZETÉS

A rovarok a Föld ma élő állatvilágának egyik legnépesebb csoportja. A rovarok átalakulással fejlődnek. A metamorfózist irányító hormonrendszer általában ismert, ennek genetikai szabályozásáról /metamorfózis irányítása/ azonban jóformán semmit sem tudunk. Ennek megismerése általános fejlődésbiológiai jelentőséggel is bír.

A metamorfózis genetikai szabályozásának megközelítése genetikai módszerek alkalmazását igényli. A genetikai analízis lehetővé teszi az egyes funkciók, illetve a mögöttük álló gének elkülönítését. Ilyen jellegű analízis céljára megfelelő modellrendszernek látszik a *Drosophila melanogaster*.

A disszertáció első részében azokkal a vizsgálatokkal foglalkozom, amelyek során egyrészt bizonyítottam, hogy az általunk izolált letális mutánsok a 2B5 sávban elhelyezkedő komplex lokuszhoz tartoznak, másrészt meghatároztam ez utóbbi pontos genetikai térképhelyzetét. A disszertáció második része egy olyan tömegszelekciós rendszert mutat be, amely alkalmas az X-kromoszómát érintő bizonyos ritka genetikai variánsok "automatikus" kinyerésére. Összegezem a tömegszelekció kezdeti alkalmazásából nyert tapasztalatokat is.

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Komplex lokuszok - A 2B5 genetikája

Az eukarióta szervezetek és különösen az ecetmuslica *Drosophila melanogaster* genetikai tanulmányozása során alakult ki az un. komplex lokusz fogalma. A komplex lokusz egy genetikai egység, amelynek mutáns alléljei hasonló mutáns fenotípust okoznak, ugyanakkor egymás között interallélikus komplementációt mutatnak. Megjegyzendő, hogy ez a komplementáció általában nem teljes, hanem részleges, pl.: letális mutánsok esetében a transzheterozigóták egy része életképes csak, vagy a túlélők bizonyos mutáns fenotípusos tulajdonságot mutatnak, stb. Az interallélikus komplementáció miatt a komplementációs térkép általában bonyolult képet mutat. Gyakori az is, hogy a rekombinációs kromoszóma térképen az ilyen lokuszok viszonylag nagy kiterjedésűek, pl.: rudimentary: 7×10^{-2} , white: kb. 3×10^{-2} térképegység /Judd, 1976/. A komplex lokuszokkal ellentétben az un. egyszerű cisztronok mutáns alléljei a cisz-transz tesztben egymást nem komplementálják és a rekombinációs térképen kis kiterjedéssel bírnak /pl.: maroon-like:

3×10^{-4} / rosy: 8.86×10^{-3} térképegység /Finnerty, 1976/. A prokarióták esetében csak egyszerű cisztronokat ismerünk, amelyek gyakran szerveződnek operonokká, tehát magasabbrendű regulációs egységekké. Az eukarióták körében viszont gyakoriak a komplex lokuszok, bár az egyszerű cisztronok is megtalálhatók.

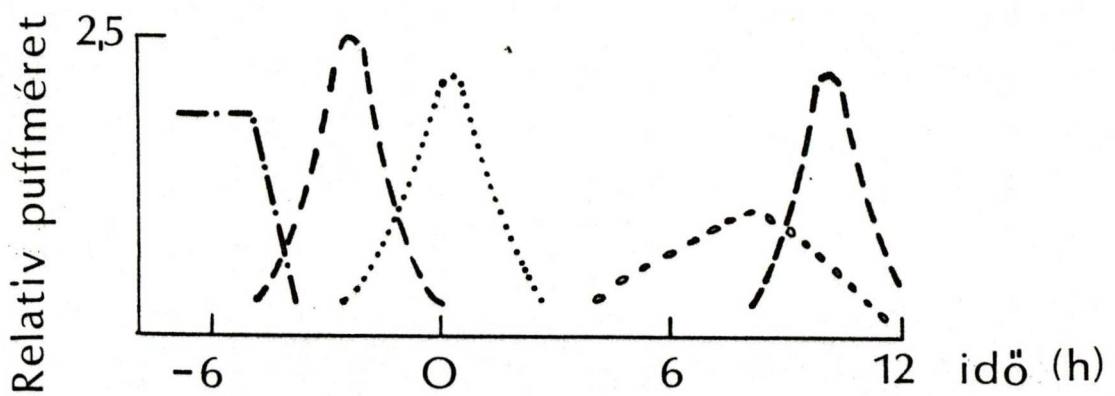
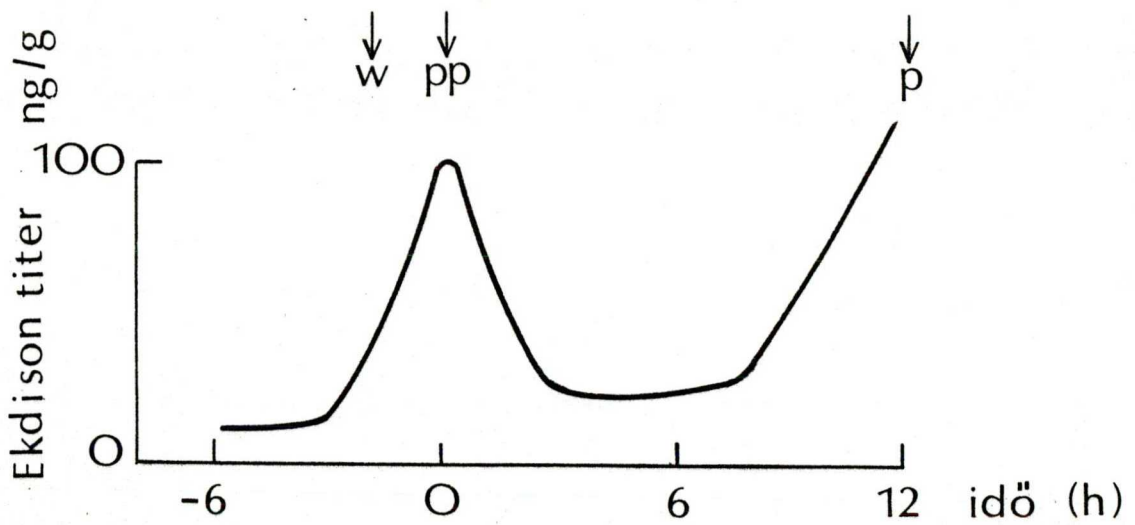
Egyelőre nem világos az, hogy a komplex lokuszok összetett genetikai szerkezete mire vezethető vissza. Lehetséges, hogy ezt - legalábbis bizonyos esetekben - valamilyen magasabbrendű regulációs szerveződés eredményezi.

Az alábbiakban a 2B5 komplex lokusz citogenetikai szerkezetét ismertetem. Az *ecetmuslica* politén lárvális nyálmirigysejtjeiben az X-kromoszóma 2B5 sávjából β -ekdizon hormon hatására 10-15 percen belül egy puff aktiválódik, amely legnagyobb kiterjedése idején a 2B1-10 régiót foglalja magában.

Ezzel kapcsolatban érdemes megemlíteni a β E által indukált puff mintázat változásokat. Puff-nak nevezzük a politén óriáskromoszómákon megfigyelhető fellazult, dekondenzálódott részleteket, amelyekben különösen aktív RNS szintézis folyik /Gersh, 1975/. A puffok tehát transzkripciósan aktív géneket képviselnek. A metamorfózis kezdetén a *Drosophila* lárvák nyálmirigy óriáskromoszómáin jellegzetes puffmintázat változások, puff-sorozatok figyelhetők meg, amelyek egyértelműen a β E koncentrációtól függenek /Clever és Karlson, 1960/. A pufforozatok az 1. ábra szemlélteti.

Az un. lárvális puffok a harmadik lárvastádium során végig aktívak, a β E hatására visszafejlődnek.

Ezután a korai- β E-indukálható puffok jelennek meg rövidebb időn belül /10-15 perc/, számuk 10-nél kevesebb /Ashburner, 1972/. Aktivitásukhoz a hormon állandó jelenléte szükséges, és 500-szoros koncentrációs tartományon belül a puff-átmérő arányos a jelenlévő β E mennyiségével. A β E még a fehérjeszintézis teljes gátlása esetében is képes ezeket a puffokat indukálni. Ennek alapján valószínűsíthető, hogy a korai



- βE titer
 - .- Larvális puffok
 - korai E. specifikus
 - késői E. specifikus
 - oooo intermedier puffok
- w: vándorló lárvák
- pp: előbáb
- p: báb

1. ábra Puffmintázat és az ekdizonkoncentráció változása a *Drosophila melanogaster* metamorfózisának kezdetén /Ashburner és Richards, 1976. nyomán/

puffok a βE elsődleges hatáshelyeit képviselik.

A kései βE -indukálható puffok száma már néhány száz, aktivitásuk a hormonstimulus után néhány órával következik be, és aktivitásuk mértéke sokkal kevésbé függ a βE koncentrációjától. A fehérjeszintézis gátlása esetében a kései puffok nem aktiválhatók.

Az un. átmeneti puffok időben az előző csoportot követik, és indukciójuk nem kapcsolódik a βE megjelenéséhez.

Önként adódik a gondolat, hogy a puffmintázat változása az egyes puffok és egyéb transzkripciósan aktív helyek regulációs kölcsönhatásának az eredménye. Ezt a βE feltehetőleg a korai puffokon keresztül indukálja /Ashburner és Richards, 1976/.

A már említett 2B5 puff a korai ekdizon specifikus csoportba tartozik. Egy novoszibirszki kutatócsoport mutánsokat izolált a 2B1-10 régióban, azt mintegy "telítve" mutációkkal /Belyaeva és mtsai, 1978/. A más laboratóriumok által már korábban találtakat is ideszámítva, összesen 38 mutánst gyűjtöttek össze a régióban. Ezek komplementációs térképét a 7. ábra szemlélteti /lásd az Eredmények c. fejezetben/. Komplementációjuk alapján a mutánsok három csoportba sorolhatók. Az első csoport dor /deep orange/, a második a swi /singed wings/, amelyek "szokványos", egyszerű komplementációt mutatnak. A dor már régebben ismert. A harmadik csoport mutánsai egyetlen nagy komplexet alkotnak, amelyen belül hat alcsoport különíthető el. Az rbp /reduced bristles on palpae/, br /broad/, l(1)pp-1 és l(1)pp-2 csoportok alléljei a csoportok között teljes komplementációt adnak, míg a másik két csoport vagy rész-

ben /pl.:l(1)t143/ vagy teljesen /pl.: l(1)t435/ "átfedí" az előző csoportokat. Ez annyit jelent, hogy a transzheterozigóta kombinációk nem életképesek, nem komplementálnak. A bonyolult komplementációs kép oka, valamint a genetikai szerkezet és a citológiai funkció /puff/ összefüggése egyelőre ismeretlen. Lehetséges, hogy a komplex genetikai lokusz a 2B5 puff megfelelője. Tekintettel a korai E-specifikus puffoknak a korai E hatásban játszott, feltételezhetően lényeges szerepére, e mutánsok további vizsgálata lényeges felismerésekre vezethet a βE hatásmechanizmusát és a metamorfózis kezdeti szabályozását illetőleg.

Rekombinációs finomtérképezés *Drosophila*-ban

A genetikai térképezés leggyakrabban különböző gének, cisztronok egymáshoz viszonyított sorrendjének és távolságának megállapítását jelenti. A rekombináció azonban egy adott cisztron határain belül is lehetséges, és lehetővé teszi a cisztronon belüli mutációs pontok sorrendjének és távolságának meghatározását is. Az ilyen finomtérképezés elvi alapja ugyanugy a két pont közötti rekombinációs gyakoriság, mint az egymástól nagyobb távolságra lévő gének térképezésének esetében. Súlyos gyakorlati problémaként jelentkezik azonban a rekombinációs alacsony gyakorisága, amely a távolság rövidülésével nagymértékben csökken. Az alapvető probléma tehát az, hogy óriási utódszámot $10^4 - 10^6$ kell átvizsgálni ahhoz, hogy a néhány rekombinációs egyed



kiszűrjük. Baktériumok és fágok esetében ez a feladat még megoldható egyszerű vizuális megfigyeléssel, a *Drosophila* esetében azonban ez már túlságosan nagy feladat. Olyan módszerekre van szükség, amelyek vagy szelektíve nagymértékben csökkentik a nem-rekombináns utódok egyedszámát, vagy pedig lehetővé teszik a rekombinánsok gyors kvantitatív visszanyerését a nagyszámu egyéb utód közül.

Az alábbiakban olyan irodalmi eredményeket ismertettünk, amelyek a *Drosophila* gének finomtérképezése során születtek. E vizsgálatok bizonyították, hogy a cisztron a magasabbrendű eukarióták esetében is mutációs helyek sorozatából áll, amelyek rekombinációval elkülöníthetők ugyanugy, mint a prokarióták esetében. Egészen kis távolságok esetében itt is fellepnek a prokariótákban megismert zavaró hatások /génkonverzió, negatív interferencia/. Mindez arra utal, hogy a rekombinációs mechanizmus a prokarióták és eukarióták esetében hasonló kell legyen. A következő ismertetésben a fő hangsúlyt azokra a technikai megoldásokra helyezzük, amelyek a térképezés nagy felbontását, a nagy utódszám átvizsgálását lehetővé teszik.

A r o s y /ry/ lokusz finomstrukturális analízise Chovnick és munkatársai nevéhez fűződik /Chovnick és mtsai, 1977/. A harmadik kromoszómán lévő ry lokusz a xantindehidrogenáz enzim strukturgénje, amelyhez egy szabályozó régió is kapcsolódik. Mérések szerint a strukturgén két végén lévő mutáns pontok távolsága 5×10^{-3} , a mellette lévő szabályozó régió hossza $5,4 \times 10^{-3}$ térképegység. A szomszédos mutációs pontok közötti távolság 10^{-4} nagyság-

rendbe esik. A nagy felbontású finomtérképezést letális markermutációk alkalmazása tette lehetővé /2. ábra/.

A különböző ry allélokat hordozó kromoszómákon két-két letális mutációt alkalmaztak / $\ell_1 \ell_2$, illetve $\ell_3 \ell_4$; 2. ábra/.

Nőstény szülő	Hím szülő	Tulélő rekombináns
A $\frac{\ell_1 \ell_2 \underline{ry}^x + + +}{+ + + \underline{ry}^y \ell_3 \ell_4}$		+ + + + + +
	X $\frac{\ell_1 + \underline{ry} \ell_3 +}{+ \ell_2 \underline{ry} + \ell_4}$	
B $\frac{\ell_1 \ell_2 + \underline{ry}^y + +}{+ + \underline{ry}^x + \ell_3 \ell_4}$		+ + $\underline{ry}^x \underline{ry}^y$ + +

2. ábra Szelektív rendszer a rosy mutánsok térképezésére
/Finnerty, 1976. nyomán/

A letális mutációk a ry közvetlen közelében helyezkednek el, így a közöttük lévő rekombináció minimálisra csökkent. A nem-rekombináns utódokat a letális marker-mutációk megölik, a letálisok közötti rekombinációknak pedig csak egy-negyede $\ell_1-\ell_2$, illetve $\ell_3-\ell_4$ /, illetve

ciójára. A teljes utódpopuláció egyedszámát úgy becsülték meg, hogy a kulturák 1/60-ad részéből kihagyták a purint, s így a teljes utódmennyiséget megkapták. Megjegyzendő, hogy ez a "purinszelekció" a rosy esetében is használható.

A harmadik példánk a r u d i m e n t a r y /r/ komplex lokusz, amely az X-kromoszómán helyezkedik el. Az elnevezés /rudimentary = csökevényes/ a szárny fejletlenségére utal, amely r/r homozigótáknál szembetűnő. A mutáció anyai hatást is mutat, amennyiben r/r nőstények utódai között az r/r vagy r/Y egyedek nem életképesek. Ugyanakkor, ha ilyen utódok r/+ heterozigóta anyától származnak, teljes mértékben életképesek. Az r allélek egymás között igen bonyolult komplementációs képet adnak. Összesen 7 komplementációs csoport különböztethető meg, amelyek azonban részlegesen átfedik egymást. A lokusz kiterjedése mintegy 0,07 térképegység.

A r lokusz finomtérképezését P.S. Carlson végezte el /Carlson, 1971/. Az interallélikus rekombinációból származó ritka r⁺ utódok szelektálására a fent említett anyai hatást használta ki, nagyon szellemesen. A szelekció alapja az, hogy r₁/r₂ x r₁/Y keresztezésből csak az r⁺ rekombinációk, valamint a r homozigóta és hemizigóták egy kis része él túl. A túlélő r, "escaper" legyek gyakorisága allélkombinációnként változik, de a kombinációra nézve állandó, így felhasználható az összes r utód számának becslésére is. Ennek a módszernek a segítségével Carlson részletes finomtérképet készített, amely 45 r allélt foglal magában.



A fentiekben ismertetett finomtérképezési módszerek a kettős-letális módszer kivételével olyan "trükköket" használtak, amelyek csak az adott mutáns gén esetében voltak alkalmazhatók. A kettős-letális módszer, amelynek használatát a rosy esetében a harmadik kromoszómán mutattuk be, elvben más kromoszómákon is alkalmazható. Az X-kromoszóma azonban kivételt képez, mert az X/Y hemizigóta him nem hordozhat letális mutációt, ezért az \underline{l}_1 , \underline{l}_2 , \underline{l}_3 , \underline{l}_4 , letális marker-mutációt hordozó heterozigóta nőtényt nem lehet a megfelelő letális hímekkel visszakeresztezni /vesd össze: a 2. ábrával/. A letális mutációt hordozó himet életben lehet tartani megfelelő \underline{l}^+ transzlokáció segítségével, ez azonban életben tartaná az F_1 generáció megfelelő letális nemzedékét is, és így éppen a szelekció nem érvényesülne.

Célunk az X-kromoszóma 2B5 régiójában elhelyezkedő komplex lokusz finomtérképezése, valamint a lokuszt érintő kromoszóma átrendeződések igazolása volt. Mivel erre a célra a fentebb említett módszerek egyike sem alkalmas, egy olyan új módszert dolgoztunk ki, amely az X-kromoszómán általánosan használható, ritka genetikai variánsok visszanyerésére. A módszer alapja a reverzibilis paralizis jelensége, amelyet a shibire^{ts1}/shi^{ts1}/mutációt hordozó egyedek 29°C-on mutatnak. A következő fejezetben részletesen foglalkozunk ezzel a jelenséggel.

Hőérzékeny paralitikus mutánsok

A *Drosophila melanogaster* X-kromoszómáján Suzuki és munkatársai /Grigliatti és mtsai., 1972/ irtak le olyan géneket, amelyeknek mutánsai 22°C-on normálisan fejlődnek, illetve normálisan viselkednek, 29°C-on azonban megbénulnak. Ilyen recesszív génmutánsok a shibire^{ts1} /térképhelyzete: 52,2/, a paralytic^{ts} /térképhelyzete: 54,1/ és a stoned /térképhelyzete: 66,3/. Mivel ezek közül a shi^{ts1} mutációt használtuk, ezért részletesen ennek fenotípusával foglalkozunk.

A shi^{ts1} homozigóta, illetve hemizigóta egyedek fejlődése 22°C-on vagy ennél alacsonyabb hőmérsékleten zavartalan. 29°C-ra téve ezeket az állatokat, a paralízis egy percen belül bekövetkezik, és mindaddig fennáll, amíg magas hőmérsékleten tartjuk őket. A paralízis az embrió, a lárva, a báb és adult esetében egyaránt bekövetkezik, pl. a lárva nem tud a tojásból kikelni, az adult nem tudja a bábót elhagyni. A bénulás reverzibilis, ha ugyanis a bénult állatokat 22°C-ra helyezzük vissza, néhány perc alatt magukhoz térnek, minden utólagos következmény nélkül. 22°C és 29°C közötti hőmérsékleten, tehát pl.: 25°C-on a paralízis szintén bekövetkezik, de jóval hosszabb idő alatt. 29°C-on a paralízis mindaddig fennáll, amíg az állatokat a magas hőmérsékleten tartjuk. Órák múlva ez a mozdulatlan állat kiszáradásához, elpusztulásához vezet. Genetikai szempontból tehát a shi^{ts1} kondicionális /hőérzékeny/ letális mutáció.

A paralitikus fenotípus magyarázata a mutáns idegrendszerben keresendő, és számos vizsgálat igazolja, hogy a mutáns gén az idegsejtekben nyilvánul meg. Ennek pontos molekuláris mechanizmusa még nem ismert. Az embrionális fejlődés során a shi^{ts1+} gén valószínűleg egyéb szövetek fejlődésében is szerepet játszik, ugyanis az embrionális fejlődés különböző szakaszaiban adott, rövid ideig tartó hőkezeléssel /shift up/ különböző torzulásokat sikerült kiváltani a szem és általában az imágókorongokból differenciálódó struktúrák fejlődésében /Dietrich és mtsai., 1980/.

ANYAG ÉS MÓDSZER

1. *Drosophila* tenyészetek fenntartása

A tenyészeteket 25 x 80 mm-es fiolákban vagy fél literes tejesüvegekben neveltük, Lewis-féle táptalajon /lásd: Függelék 2./. A kísérleti keresztezéseket 25°C, 22°C vagy 18°C-on végeztük, a törzstenyészetet 18°C-on tartottuk fenn. A lárvák normális fejlődési üteme 25°C-on négy nap, míg 22°C-on kb.: öt nap.

A keresztezéshez szükséges szüz nőstényeket a következőképpen gyűjtöttük: amikor az üvegben megjelennek a kikelésre kész bábok, az üvegekből eltávolítjuk az esetleg ott maradt egy-két szülőt vagy korábban kelő utódot, és az üvegeket 18°C-ra tesszük. Ezen üvegekből 24 óránként legyűjtjük a kikelt adultokat és a nőstényeket kiválogatjuk. Mivel a frissen kelt adultok 18°C-on tartva 24 órán belül még nem képesek párosodni, az így szelektált nőstények feltételezhetően szüzek lesznek. Mindenesetre a nőstényeket táptalajon tartjuk néhány napig, majd ellenőrizzük, hogy valóban szterilek-e.

2. Letális mutánsok

Az általunk vizsgált letális mutánsok a *Drosophila melanogaster* X-kromoszómájának 2B1-10 régiójában helyezkednek el. Valamennyi mutánst EMS-el indukálták Lewis and Bacher /1968/ módszere szerint. A mutánsokat és származási helyüket, valamint a mutáns-kromoszómán levő egyéb mutáci-

ókat az 1. táblázat mutatja. A letális mutánsokat balanszer kromoszómák /Binsn vagy FM6/ segítségével tartottuk fenn /Függelék 1./.

Letális mutáció	A kromoszómán eredetileg lévő egyéb marker-mutáció	Származása
$\lambda(1)npr-1$	y w sn ³ cv	Szeged
$\lambda(1)npr-2$	y w	/saját izolátum/
$\lambda(1)d.norm-1^a$	y w	J.W. Fristrom Berkeley, USA
t324	y	E.S. Belyaeva
t242	y	I.F. Zhimulev
t200	y	Novoszibirszk,
t 99	y	SZU
t 81	y	
t 35	y	
t 10	y	
t 4	y	

3. Komplementációs vizsgálatok

A komplementációs teszt során olyan egyedeket hozunk létre, amelyek két különböző mutációt egy kromoszómapár két tagján, transz-helyzetben hordoznak. Vizsgáljuk, hogy a mutáns fenotípus(ok) megnyilvánul/nak/-e? Ha a transzheterozigóta egyed vad típusu, megállapítható, hogy a két mutáció két különböző cisztronba, tágabb értelemben véve két strukturgénbe tartozik.

4. Genetikai térképezés

A./ Az $\ell(1)npr-2$ térképhelyzetének megállapítása

Egy kromoszóma két pontja közötti távolság a két pont közötti meiotikus rekombináció gyakoriságával mérhető. Mivel a *Drosophila melanogaster* esetében rekombináció csak a női petesejt meiozisa során játszódik le, olyan nőtényeket kellett létrehozunk, amelyek heterozigóta formában hordozzák a letális kromoszómát és egy másik "térképező" kromoszómát. A rekombinációból származó új kromoszóma-változatok e nőtények F_1 him utódaiban vizsgálhatók. Az eredményekből megállapítható a vizsgált gének sorrendje és a marker mutációktól mérhető távolságuk is. A kísérletben a $y \ell(1)w npr-2$ mutánst a $y^+ sc \ell^+ w^+ ec cv$ kromoszómához térképeztük. A letális mutációk térképezésével kapcsolatos megfontolásokat a Függelék 3. fejezete ismerteti.

A $y \ell(1)w npr-2$ esetében a térképhelyzetet elsősorban a letális kromoszómán lévő y és w markerek segítségével határoztuk meg. A keresztezésekben legalább ezer F_1 him utódot vizsgáltunk meg.

B./ Finomtérképezés

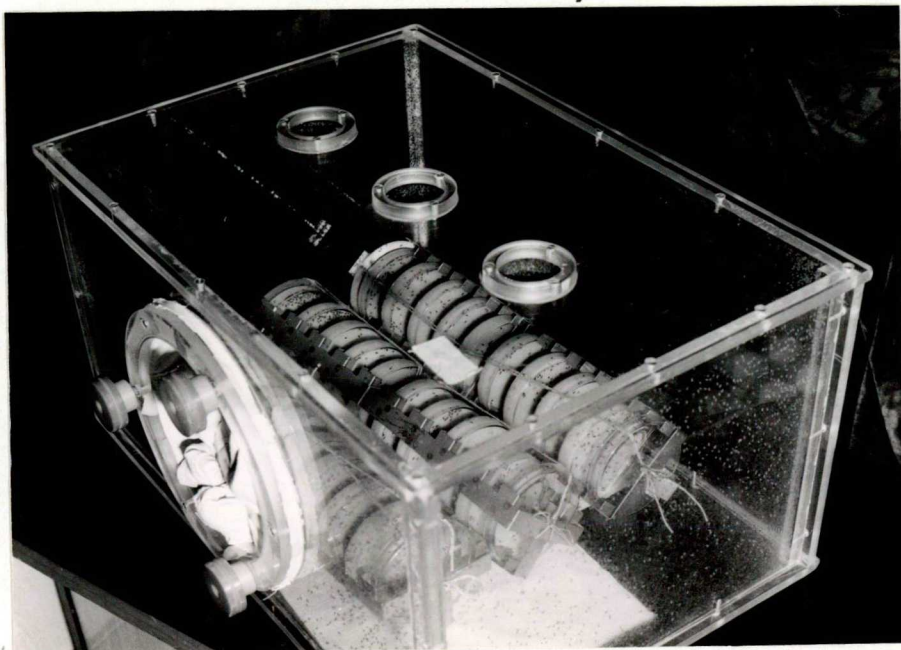
A shi^{ts1} paralitikus fenotípust felhasználó finomtérképezési módszerrel az Eredmények c. fejezetben foglalkozunk részletesen.

5. Tömegtenyésztés

Az általunk alkalmazott tömegtenyésztési és tömegszelekciós módszer önálló, irodalmi előzménnyel nem rendelkezik. Ez, mint kísérleti eredmény is értékelhető, de úgy gondolom, hogy a technikai részletek kedvéért helyesebb itt tárgyalni.

A tömegszelekcióhoz nagy mennyiségű, százezres egyedszámú *Drosophila* populáció szükséges. A szokásosan alkalmazott módszerrel /lásd: 1. pont/ nem oldható meg ilyen mennyiségű adult légy előállítás. Nagy egyedszám elérésére új módszert kellett kidolgozni. *Drosophila* tömegtenyésztésre J.I. Fristrom közölt egy módszert, ez azonban csak lárvák tömeges méretű nyerésére alkalmas. Ennek lényege, hogy a petéző *Drosophila* populációt egy "populációs ládában" tartja, és műanyag dobozokba öntött táptalajra petézteti. A lárvák a dobozokban fejlődnek. Ezt a módszert próbáltuk először, azonban a lárvák számához képest aránytalanul kevés imágót nyertünk vissza. Ennek oka valószínűleg az volt, hogy a lárvák nem találtak elég helyet a bábozódáshoz a doboz oldalfalain, ezért nagyobb részük kénytelen volt a táptalaj felszínén bábozódni. Ezek a bábok általában beleragadnak a táptalajba, és a belőlük kikelő legyek elvesznek. Új módszert kellett kidolgozni, amely biztosítja a nagy peteszámot, optimális fejlődési lehetőséget és egyben elég felületet biztosít a bábozódáshoz is. A mi módszerünk a következő volt:

A./ Petéztetéshez szüz nőstényeket üvegben kelő le-
gyekből gyűjtöttük. Mivel a hímek is hordozták a recesszív
shi^{ts1} mutációt, amely 29°C-on bénulást okoz, a populációt
22°C-on neveltük fel. A szüzgyűjtéskor a 18°C-on tartott
és egy napon belül legyűjtött populációt rövid időre /10-
15 perc/ 29°C-ra tettük, és a paralizált hímeket eltávolí-
tottuk. A nőstény populációt CO₂-os "altatással" sztereo-
mikroszkóp alatt ellenőriztük. A petéztetést "populációs
ládában" 22°C-on tizezer "érett" adulttal /kb.: 6.000 ♀♀
és 4.000 ♂♂/ indítottuk. A ládában bakteriológiai Petri
csészékbe /Ø: 90 mm, kb.: 80 ml/ öntött táptalajra petéz-
tettünk. A Petri csészékhez megfelelő tartó állványokat
készítettünk /3. és 4. ábra/.



3. ábra Petegyűjtés populációs ládában

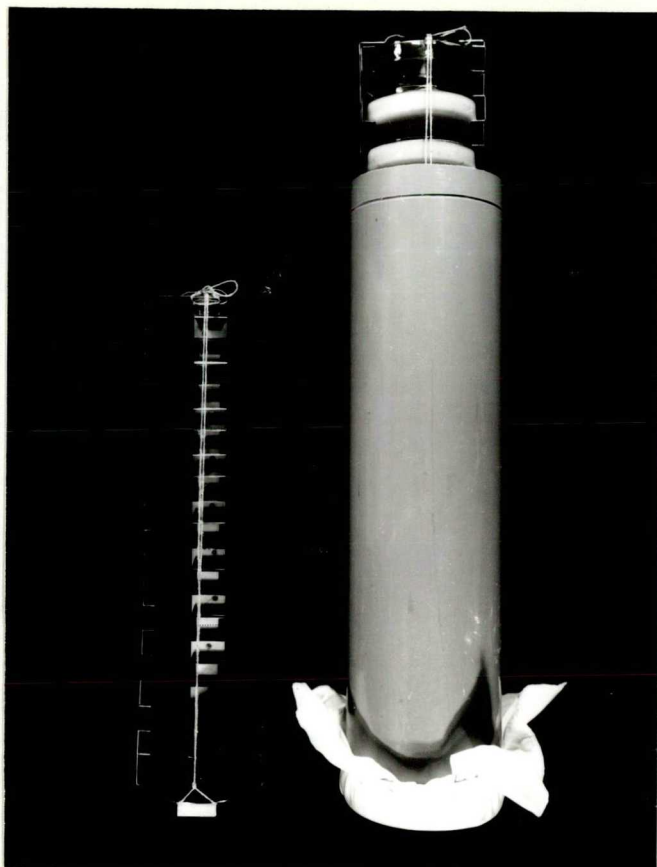
A plexi ládában a táptalajos Petri csészéket hordozó
állványok láthatók.

Egy állványba kilenc csészét tettünk, amelyeket így, állvánnyal együtt lehetett mozgatni. A Petri csészéket 12 óránként egyszerre cseréltük. A peterakást serkentette a táptalaj felületének barázdálása és élesztőzése. A táptalaj cserélésekor az adult állatokat süritett levegő ráfúvatásával "mostuk" le a táptalaj felületéről.

B./ Az utódpopuláció felnevelése

Ugyanazon Petri csészében és állványokban neveltük fel az állatokat, amelyekre petéztettünk. A teli állványokat 500 mm magas és 130 mm Ø PVC csőből készült hengerekbe helyeztük /lásd: 4. ábra/, amelyekben alulról 50 mm magasságban egy vasrud volt keresztben beerősítve. Ez tartotta az állványt, és megakadályozta annak kiesését. A hengerek alját és tetejét nylon fátyolszövettel zártuk el, és 20-22°C-os hőmérsékletű helyiségben tartottuk. Ez az elrendezés több problémát is megoldott, amelyek a tenyésztés során jelentkeztek :

- a táptalajból elpárolgó, a hengerek falán lecsapódó kondenz víz az alsó nyíláson el tud távozni;
- a megadott méretezésnél és hőfokon a tenyészet megfelelő levegőztetése biztosítva van /a CO₂ nem halmozódik fel/, ugyanakkor a táptalaj nem szárad ki túlzottan;
- a légcserével a táptalajban termelődő hő is eltávozik, ami a hőérzékeny shi^{ts1} lárvák életbenmaradásának és fejlődésének feltétlen követelménye.



4. ábra Tömegtenyésztéshez használt állvány és henger

C./ A kikelt imágók gyűjtésé

Az adult kelés kezdetétől két naponként gyűjtöttük a legyeket. Legelőször a hengereket CO_2 gázzal töltöttük fel, amitől a legyek átmenetileg elkábultak, és lehullottak a henger aljára. Az állványt kiemeltük a hengerből, a Petri csészék felületére hullott legyeket a CO_2 -dal töltött gyűjtőhengerbe ráztuk, majd az előző hengerből is átöntöttük a legyeket a gyűjtőhengerbe. Az összegyűjtött legyek kerültek tömegszelekcíóra.

6. Tömegszelekció

Tömegszelekció útján különítettük el a vad, $\text{shi}^{\text{tsl}^+}$ fenotípusu tömegből azon ritka legyeket, amelyek shi^{tsl} feno-

tipust mutattak, azaz 29°C-on paralizálódtak. A szelekció elve egyszerű: ha a szelektálandó légytömeget 29°C-ra helyezzük, a shi^{ts1} fenotípusu legyek megbénulnak, azaz lenn maradnak az edény alján, míg a nem paralizáló shi^{ts+} fenotípusu legyek felfelé másznak vagy repülnek. A szelekció kivitelezésére egy egyszerű készüléket szerkesztettünk /5. ábra/, amelyben ötven-százezer légyből is 30-40 perc alatt kvantitativ kiválaszthatók a shibire^{ts} fenotípusu imágók. A módszer részletes leírását az alábbiakban adjuk meg :

- kiindulási légszám meghatározása: az összegyűjtött légytömeg súlyát 0,1 mg pontossággal lemérjük, és elosztjuk egy légy átlagos súlyával. Az utóbbit minden mintából kb.: ezer megszámlolt légy súlyából határoztuk meg.
- A CO₂-dal elkábitott legyeket a szelektor készülékbe szórtuk. A szelektor készüléket az 5. ábra mutatja.

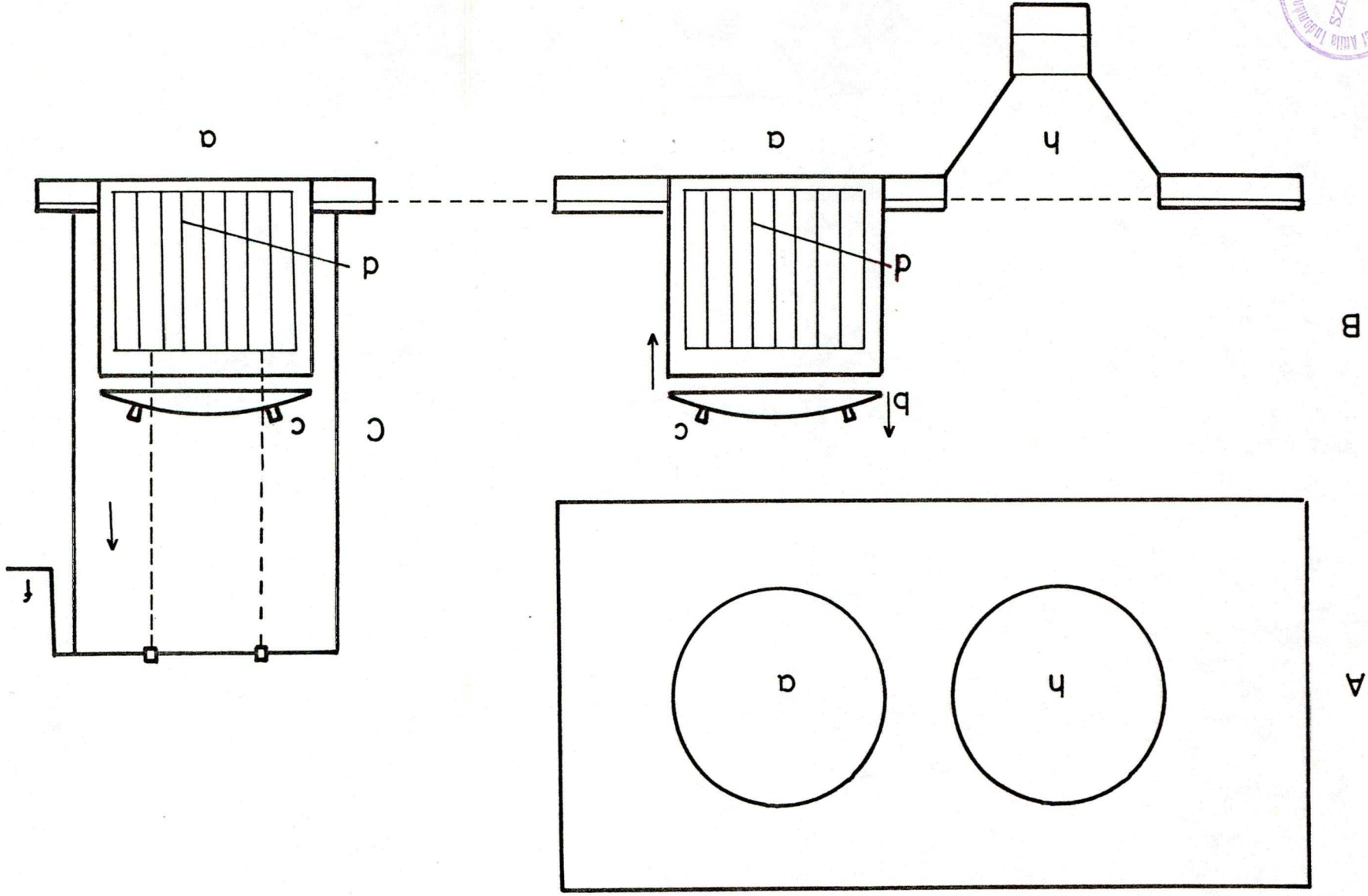
A szelektor használata: alapállásban a köralaku mélyedésbe /a/ egy papír körlap van behelyezve, a szelektor hengere az /a/ mélyedés fölé van tolva, és a benne lévő rácsbetét rá van eresztve a papírlapra /5. ábra, B./.

- A szelektor-henger tetejét /b/ felemeljük, és a rácstra szórjuk az elkábitott legyeket.
- A szelektor felső részét lezárjuk, a tetején lévő nyílásokba /c/ ecetes-alkoholos vattát teszünk /d/, amely a legyeket csalogatja, és a felfelé mászásukat elősegíti. A szelektor felső része áttetsző műanyag, így a felülről

bejutó fény is vonzza a legyeket. A shi^{ts} legyek leesnek, illetve paralizálva alul maradnak a papírlapon, míg a shi^{ts+} legyek felmásznak a leengedett rácsra.

- 30 perc eltelte után a rácsot óvatosan felemeljük a csörlővel /f/, majd rögzítjük.
- A szelektort a gyűjtőtölcsér /h/ fölé toljuk, és így a szelektor alatti mélyedés /a/ szabaddá válik. A papírlapot kiemeljük a mélyedésből, és néhány perces várakozás után - amely idő alatt a papíron maradt shi^{ts+} legyek eltávoznak - a papíron lévő legyeket egy üres, 18°C-os üvegbe rázzuk. Az üveget 18°C-on tartjuk 30-40 percig, így a shi^{ts} legyek visszanyerik mozgásképeségüket.
- Az így visszanyert anyagot mikroszkóp alatt szétválogatjuk, majd ismét 29°C-on ellenőrizzük a shi^{ts}-shi^{ts+} fenotípust.

5. ábra



5. ábra A szelektor vázlatos szerkezete és működése

A - a szelektor felülnézete

B - a szelektor oldalnézete

C - a szelektor előlnézete

a./ mélyedés a paralizált legyek gyűjtésére;

b./ a szelektor hengerének fedele;

c./ nyílások a fedélen;

d./ mozgatható betétrács;

f./ betétrácsot mozgató csörlő;

h./ tölcser a shi⁺ legyek összegyűjtésére.

EREDMÉNYEK

Munkánk során először komplementációs teszt segítségével kimutattuk, hogy a laboratóriumunkban izolált $\ell(1)npr-1$ és $\ell(1)npr-2$, valamint a $\ell(1)d.norm-1^a$ letális mutánsok allélikusak annak a komplex lokusznak a mutánsaival, amelyet egy novoszibirszki kutatócsoport a 2B5-6 puff régióban írt le /Belyaeva és mtsai., 1980/. Ezután klasszikus géntérképezési eljárással meghatároztam a $\ell(1)npr-2$ pontos helyét az X-kromoszóma térképén, majd a tömegszelekciós módszer felhasználásával megkezdtem a puffrégió mutánsainak finomtérképezését. Ennek kezdeti eredményeit ismertetem az alábbiakban.

Végül foglalkozom azon kísérletekkel is, amelyek során a tömegszelekciós módszerrel olyan X; Y transzlokációs kromoszómákat nyertem vissza, amelyek töréspontja a komplex lokusz közelében vagy annak területén helyezkedik el. A továbbiakban a transzlokációt szenvedett kromoszómadarabokat - a *Drosophila*-irodalomban használt elnevezésnek megfelelően - duplikációnak nevezzük.

1. Komplementációs kísérletek

A komplementációs tesztet annak eldöntésére használják, hogy két különböző mutáció ugyanazon génben következett-e be vagy sem. A kísérlet általános sémáját a 6. ábra mutatja. Ennek során megfelelő genetikai keresztezés segítségével olyan transzheterozigóta egyedeket hozunk létre,

$$\begin{array}{l}
 P \quad \text{♀} \quad \frac{y \ell^1 \ell^{2+} w}{\text{Binsn}} \quad \times \quad \frac{y \ell^{1+} \ell^2 w^+}{Y_{\ell^+}} \quad \text{♂} \\
 \\
 F_1 \quad \frac{y \ell^1 \ell^{2+} w}{y \ell^{1+} \ell^2 w^+} ; \frac{\text{Binsn}}{y \ell^{1+} \ell^2 w^+} ; \frac{y \ell^1 \ell^{2+} w}{Y_{\ell^+}} ; \frac{\text{Binsn}}{Y_{\ell^+}} ;
 \end{array}$$

6. ábra Keresztezés X-kromoszómához kötött letális mutánsok komplementációjának vizsgálatára

amely mindkét mutáns kromoszómát hordozza. A keresztezéshez szükségünk van egy olyan ℓ^+ duplikációra, amely az egyik letális kromoszómát hordozó hímeket életképesé teszi. Erre a célra a $\underline{Dp(1)Yy^{2+}}$ kromoszómát használtuk. Ha az F_1 utódok között a transzheterozigóta ♀ kombináció megjelenik, ez arra utal, hogy a mutációk két külön génben vannak. A transzheterozigóta állatok hiánya viszont azt jelenti, hogy mindkét letális mutáció ugyanazon gén /cisztron/ területére esik. E szabály alól kivételt képez az un. intracisztronikus komplementáció, amely több, azonos alegységekből álló enzimfehérjét kódoló gének esetében figyelhető meg /Garen és Garen, 1963/.

Esetünkben azt vizsgáljuk, hogy a laboratóriumunkban előállított mutánsok - amelyek metamorfózisban gátoltak - [$\underline{\ell(1)npr-1}$, $\underline{\ell(1)npr-2}$] allélikusak-e a 2B5 puffrégióban elhelyezkedő letális mutánsokkal. Megvizsgáltuk az $\underline{\ell(1)d.norm.-1^a}$ mutánst is, amelyet J.W.Fristrom-tól kaptunk.

A komplementációs teszt elvégzését a hasonló fenotípus /metamorfózis gátlása/ és a közel azonos genetikai térképhelyzet indokolta. Egy ilyen komplementációs keresztezést szemléltet a 2. táblázat.

2. táblázat Komplementációs teszt a $\ell(1)npr-2$ és a 2B5 lokuszba tartozó letális mutánsok (ℓ) között

$$\text{Keresztezés : } \underset{\text{♀}}{\frac{y \ \ell(1)npr-2 \ w}{\text{Binsn}}} \times \frac{y \ \ell}{Y\ell^+} \underset{\text{♂}}{\phantom{\frac{y \ \ell(1)npr-2 \ w}{\text{Binsn}}}}$$

ℓ	F_1 utódok genotípusa				Összegyedszám
	$\frac{y \ \ell(1)npr-2 \ w}{y \ \ell} \underset{\text{♀}}{\phantom{\frac{y \ \ell(1)npr-2 \ w}{y \ \ell}}}$	$\frac{\text{Binsn}}{y \ \ell} \underset{\text{♀}}{\phantom{\frac{\text{Binsn}}{y \ \ell}}}$	$\frac{y \ \ell(1)npr-2 \ w}{Y\ell^+} \underset{\text{♂}}{\phantom{\frac{y \ \ell(1)npr-2 \ w}{Y\ell^+}}}$	$\frac{\text{Binsn}}{Y\ell^+} \underset{\text{♂}}{\phantom{\frac{\text{Binsn}}{Y\ell^+}}}$	
t4	-	354	229	56	639
t10	-	348	247	132	727
t35	-	235	180	137	552
t81	191	167	162	88	608
t200	173	177	124	93	567
t242	204	222	153	81	660
t324	-	150	123	53	326
t336	-	315	173	78	567
Df(1)RA-19	-	245	238	104	587

A hasonló módon végzett további komplementációs kísérletek eredményeit a 3. táblázat foglalja össze.

3. táblázat Komplementációs kísérletek összefoglaló táblázata*

P ♂ ℓ	P ♀		
	ℓ(1)npr-1	ℓ(1)npr-2	ℓ(1)d.norm-1 ^a
t4	-	-	-
t10	-	-	-
t35	-	-	-
t81	+	+	+
t200	+	+	+
t242	+	+	+
t324	-	-	-
t336	-	-	-
ℓ(1)npr-1	-	-	-
ℓ(1)d.norm-1 ^a	-	-	-
Df(1)RA-19	-	-	-

* Rövidítések: + = komplementáció van, a transzheterozigóta nőstények életképesek;
- = komplementáció nincs.

Az 1. és 2. táblázatból világosan kitűnik, hogy az ℓ(1)npr-1, ℓ(1)npr-2 és ℓ(1)d.norm-1^a egymáshoz teljesen hasonlóan viselkednek: teljes komplementációt adnak a t81, t200, t242 mutánsokkal, nem komplementálnak viszont egymással és a komplex lokusz egyéb mutánsaival /t4, t10,

t35, ... t324, t336/. Ez ugy értelmezhető, hogy mutánsaink a 2B5 régióban lévő komplex lokuszhoz tartoznak /7. ábra/.

<u>lt257</u>	<u>t467</u>	<u>l(1)t435</u>		
<u>lt187</u>	<u>t251</u>	<u>l(1)t324</u>		
<u>lt148</u>	<u>t219</u>	<u>npr-1</u>		
<u>lt141</u>	<u>t200</u>	<u>npr-2</u>		
<u>lt128</u>	<u>t63</u>	<u>l(1)d.norm.-1^a</u>		
<u>lt81</u>	<u>t32</u>	<u>l(1)d.norm.-24</u>	<u>t197</u>	<u>t252</u>
<u>66g</u>		<u>l(1)t143</u>	<u>t149</u>	
<u>169F</u>		<u>l(1)t126</u>	<u>t76</u>	
<u>dor</u>		<u>l(1)t4</u>	<u>t10</u>	
<u>dor</u>		<u>t376</u>	<u>t366</u>	
		<u>t358</u>	<u>t336</u>	
		<u>t144</u>	<u>t103</u>	
		<u>t132</u>	<u>t135</u>	
		<u>t99</u>	<u>br⁴</u>	
			<u>br³</u>	
			<u>br</u>	
<u>dor</u>	<u>swi</u>	<u>rbp</u>	<u>br</u>	<u>l(1)pp-1</u> <u>l(1)pp-2</u>

7. ábra A 2B1-10 régió mutánsainak komplementációs térképe*

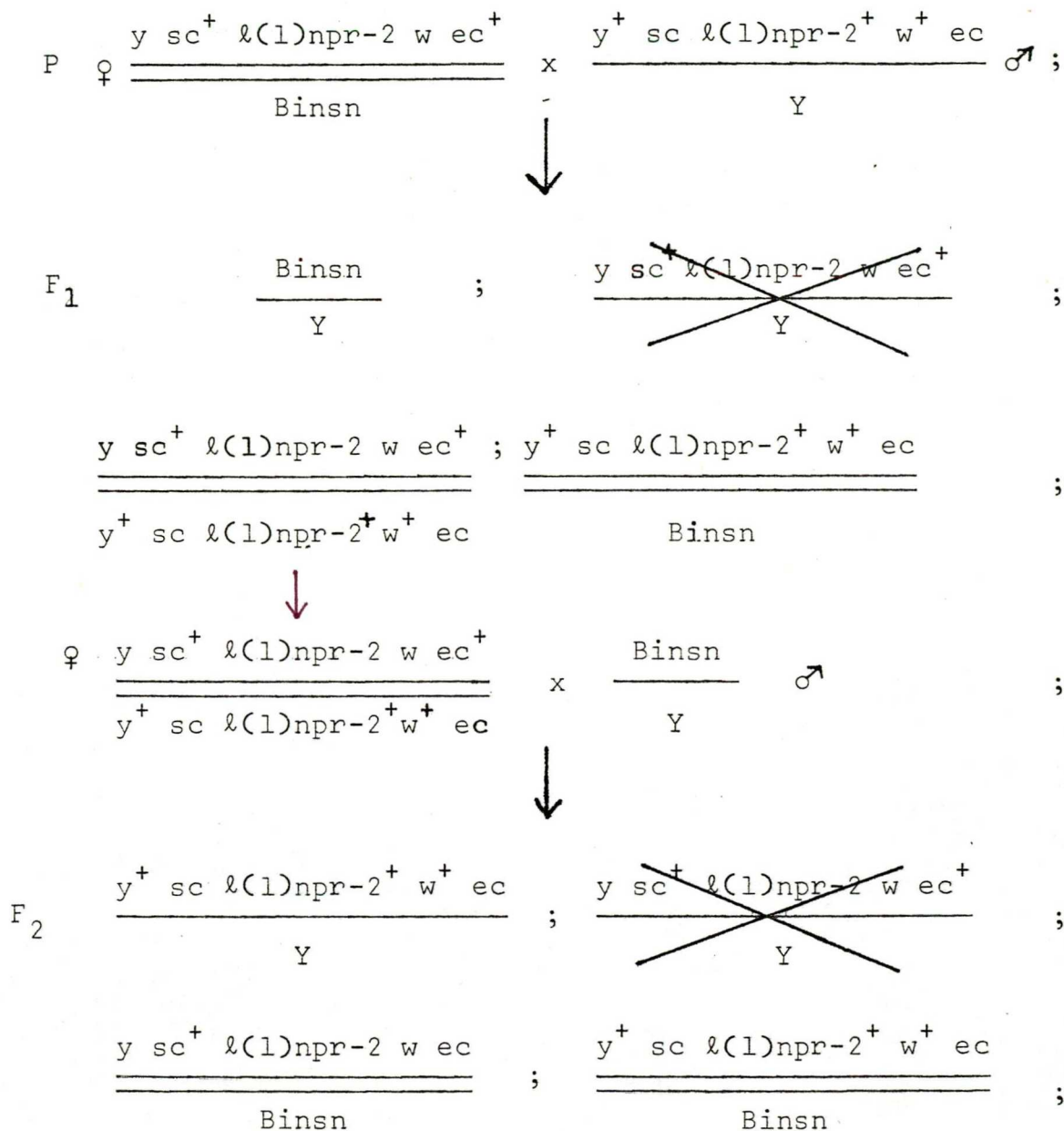
* Pirossal jelöltük az általunk használt mutáns allélokat.

2. Az l(1)npr-2 pontos helyének megállapítása az X-kromoszóma térképén

A komplementációs kísérletek arra utaltak, hogy az l(1)npr-1, l(1)npr-2 és l(1)d.norm-1^a, valamint a komplex lokusz mutánsai allélikusak egymással. Ebből az is következik, hogy genetikai térképhelyzetük is azonos kell legyen. A mutánsokra vonatkozóan az irodalomban közölt térképezési adatok azonban eltérnek egymástól /l(1)npr-1: 0.2, Kiss és mtsai., 1976; l(1)d.norm-1^a: 0.0, Stewart és mtsai., 1972/. Az eltérések feltehetőleg kísérleti pontatlanságból adódnak. Ezért végeztem el az l(1)npr-2 térképezését. A megfelelő pontosságot nagy utódszám átvizsgálásával igyekeztem

biztosítani.

A genetikai keresztezéseket a 8. ábra, az eredményeket a 4. táblázat foglalja össze.



8. ábra Az $\ell(1)npr-2$ térképezése : genetikai keresztezések

4. táblázat Az $\ell(1)npr-2$ térképezése : F_2 σ^7 utódok megoszlása genotípus szerint*

	Genotípus					Egyedszám
	y	sc	ℓ	w	ec	
Szülői genotípusok	+	-	+	+	-	3344
	-	+	-	-	+	0
Talált rekombinánsok	-	+	+	+	-	15
	+	-	+	+	+	123

* Rövidítések : + = vad típus

- = mutáns típus

A Binsn balanszer kromoszóma miatt, amely a y, sc, ℓ, w, ec tekintetében vad típusu, az F_2 nőstényekben nem vizsgálható a rekombináció eredménye. Ezért az F_2 him utódokat vizsgáltam, és a talált rekombinánsok számát az összes him utódszámhoz viszonyítottam.

A letális mutáció és a marker-mutáció közötti távolság meghatározásához az eredményeket az alábbiakban kétpon-
tos tesztként értékeljük ki. A letális mutáció és az adott marker-mutáció közötti rekombinánsok számát a megvizsgált összes him számának százalékában kifejezve, megkapjuk a marker-mutáció és a letális mutáció közötti térképtávolságot :

$$\begin{aligned} y - \ell &: \frac{15}{3518} \times 100 = 0.43 \\ sc - \ell &: \frac{15}{3518} \times 100 = 0.43 \\ \ell - w &: \frac{36}{3518} \times 100 = 1.02 \\ \ell - ec &: \frac{36 + 123}{3518} \times 100 = 4.52 \end{aligned}$$

Eszerint az $\ell(1)npr-2$ a y és w között helyezkedik el, az előbbtől 0.43, az utóbbtól 1.02 egységnyi távolságra. Megjegyezzük, hogy ezek az adatok jó additivitást mutatnak, amennyiben ha a $y - \ell$ és $\ell - w$ között mért távolságokat összeadjuk $/0.43 + 1.02 = 1.45/$, a y és w közötti irodalmilag elfogadott távolsághoz $/1.5$; lásd Lindsley és Grell, 1968/ közeli értéket kapunk.

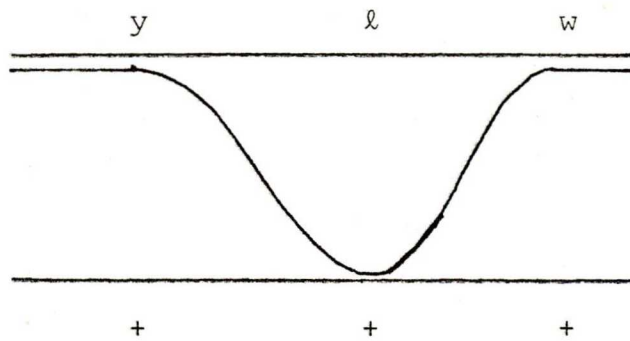
Az adatokat hárompontos tesztként is értékelhetjük, és ennek alapján meghatározhatjuk, hogy melyik két marker-mutáció közé esik az ℓ mutáció. Az 5. táblázatból látható, hogy a $y \ell^+ w$ rekombináns kategóriából egyetlen legyet sem találtunk. Megállapítható tehát, hogy ez a legritkébb rekombináns osztály, vagyis feltételezhető, hogy ennek kialakulásához kettős rekombináció szükséges. Ennek alapján a gének sorrendje: $y - \ell - w$ /9. ábra/. Az 5. táblázat adataiból hasonló módon levezethető, hogy az $\ell(1)npr-2$ mutáció pl. sc és w , sc és ec , illetve y és ec között helyezkedik el. Ez szintén összhangban van a kétpontos teszt eredményeivel és az említett marker-

5. táblázat Az $\ell(1)npr-2$ térképezése : génsorrend meghatározása a hárompontos teszt segítségével*

F ₂ ♂ genotípusa			Egyedszám
y	ℓ	w	
+	+	+	123
-	+	+	15
+	+	-	36
-	+	-	0

Rövidítések : + = vad típus

- = mutáns típus



9. ábra Génsorrend az 5. táblázat alapján

-mutációknak irodalmi adatok alapján felállítható sorrendjével /y - sc - w - ec; Lindsley és Grell, 1968/.

3. A letális mutációk helyzetének és egymás közötti távolságának meghatározása az X-kromoszómán

Előzőekben láttuk, hogy a laboratóriumunkban izolált mutánsok és az o. c. c. komplex lokusz mutánsai allélikusak egymással, de nem ismert a mutációk egymáshoz viszonyított helyzete az X-kromoszómán. Ezért célul tűztük ki a letális mutációk sorrendjének meghatározását, elsősorban a ℓ(1)npr-1, t81 és t200 vonatkozásában /10. ábra/.

A lokuszok kis távolsága miatt a várható rekombinációs gyakoriság igen alacsony, ezért a rekombinánsokat a shi^{ts} tömegszelekciós módszerrel kerestem /20. oldal/. A letális kromoszómákat a letális gén mindkét oldalán közeli marker-mutációkkal /y - w, illetve y⁺ - w⁺/ láttuk el, hogy az egyszeres crossing-overt elkülönítsük a kétszeres crossing-overtől és az esetleges génkonverziótól. Továbbiakban ismertetjük az egyes keresztezési kísérleteket és az eredményeiket.

a. Az ℓ(1)npr-1 és t200 letális mutációk közötti távolság meghatározása

A transzheterozigóta nőstényeket 22°C-on a szokásos módon állítottam elő /25. oldal/, majd néhány nap elteltével kereszteztem OR-R hímekkel /10. ábra/. A shibire^{ts} markert felhasználtam a keresztezéshez szükséges szűz nőstények

10. ábra Térképezési kísérlet sémája

P ♀ $\frac{y \ell^1 \ell^{2+} w f shi}{\text{Binsn}}$ x $\frac{y^+ \ell^{1+} \ell^2 w^+ f shi}{Y_{\ell^+}}$ ♂

↓ 22°C

F₁ $\frac{y^+ \ell^{1+} \ell^2 w^+ f shi}{\text{Binsn}}$; $\frac{y \ell^1 \ell^{2+} w f shi}{y^+ \ell^{1+} \ell^2 w^+ f shi}$; $\frac{y \ell^1 \ell^{2+} w f shi}{Y_{\ell^+}}$; $\frac{\text{Binsn}}{Y_{\ell^+}}$;

♀ $\frac{y \ell^1 \ell^{2+} w f shi}{y^+ \ell^{1+} \ell^2 w^+ f shi}$ x $\frac{y^+ \ell^{1+} \ell^{2+} w^+ f^+ shi^+}{Y}$ ♂ /ORE-R/

↓ 22°C

F₂ $\frac{y \ell^1 \ell^{2+} w f shi}{y^+ \ell^{1+} \ell^{2+} w^+ f^+ shi^+}$; $\frac{y^+ \ell^{1+} \ell^2 w^+ f shi}{y^+ \ell^{1+} \ell^{2+} w^+ f^+ shi^+}$; ~~$\frac{\ell^1}{Y}$~~ ; ~~$\frac{\ell^2}{Y}$~~ ;

$\frac{y^+ \ell^{1+} \ell^{2+} w f shi}{Y}$
Rekombináns ♂

34

gyűjtésénél. 15.000 heterozigóta nőstényt és 7.000 db OR-R /y⁺ ℓ(1)npr-1⁺ t200⁺ w⁺ f⁺ shi^{ts⁺}/ himet tartalmazó populációtól gyűjtöttük a petéket, amelyekből az F₂ adultok keltek. Az F₂ adultok számát a szelektálásra gyűjtött populáció súlyának lemérésével, valamint a párhuzamosan vett légy minta súlyának és egyedszámának ismeretében határoztam meg. A szelektálandó populáció súlyát osztva egy légy átlagos súlyával, az összesen szelektált imágók mennyisége : 311.185 darabnak adódott. Az F₂ nemzedékben vad fenotípusú nőstényeket kapok, míg a hímek a ℓ mutációk miatt elpusztulnak. A tömegszelekció során elvben a vad fenotípusú nőstények 29°C-on nem paralizálnak, a shi^{ts1} mutációt homozigóta vagy hemizigóta formában hordozó legyek viszont lennmaradnak a szelektor henger alján. A valóságban természetesen mindenféle hulladék /elhullott legyek, levetett bábíngék, táptalajszemcskék és nehezen mozgó, beteg legyek is/ felhalmozódnak a szelektor alján. Ezért szükség van a szelektorból visszanyert anyag mikroszkóp alatt történő válogatására. A szelekcióból származó shi^{ts1} legyek 18°C-on gyorsan magukhoz térnek, és széndioxidos kíméletes "altatással" mikroszkóp alatt átvizsgálhatók.

A további lépések a következők :

- elkülönítem a holt és élő egyedeket;
- ismételten leellenőrzöm az élő hímeket, hogy mutatják-e a shi^{ts1} fenotípust, vagy egyéb ok miatt maradtak a szelektor alján /pl.: sérült végtag, mozaikosan shibire^{ts1}, stb./;

- a rekombináns legyeket kiválogatom a y és w marker-mutációk alapján;
- utódanalízishez a keresztezéseket elindítom. /Feltételezett egyszeres rekombinánsokat és az egyéb "aberráns" legyeket egyenként megfelelő partnerrel keresztezem./ A 6. táblázat tartalmazza a fent említett adatokat. Az utódanalízisből következtettünk az aberráns szülők genotípusára. A kísérletet végig, azaz petegyűjtéstől az adult megjelenéséig 22^oC-on végeztük.

A y⁺ w f shi^{ts1} fenotípusu rekombináns hímeket kereszteztük a Df(1)RA-19-et és a balanszer kromoszómát /FM6 ℓ / hordozó nőtényekkel. Az utódok között vad /B⁺/ szemű, [Df(1)RA-19/y ℓ w f shi^{ts1}] nőtényeket kaptam, a hím ℓ ⁺ rekombináns X-kromoszómát hordozott.

A y w f shi^{ts1} fenotípusu hímeket az előzőekben említett heterozigóta nőtényekkel visszakeresztezve, az FM6 ℓ balanszer kromoszómát a hordozó nőtények mellett hímek is túlélnek. Ezek a hímek hordozzák a Df(1)RA-19 X-kromoszómát, amely az 1F-2B11-ig terjedő régióra deficiens /magába foglalva a 2B5-t/. A hímek túlélése csak úgy lehetséges, hogy a Y-kromoszóma ℓ ⁺ duplikációt hordoz. Ez az Y _{ℓ} ⁺ kromoszóma az apa /P ♂, 10. ábra/ által hordozott kromoszómával és valószínűleg X-Y nondiszjunkció útján került át a vizsgált utódnemzedékbe.

A y⁺ w⁺ f shi^{ts1} fenotípusu hímek egy része /6. táblázat, 5-15/ nem adott utódot, valószínűleg sterilek voltak. Akadnak olyanok /1-2/, amelyek a partner szülő FM6 ℓ balanszer kromoszómájával adnak utódot, a Df(1)RA-19 kromoszómá-

6. táblázat A $\ell(1)npr-1$ és $t200$ mutációk távolságának meghatározása

Keresztezés : $\frac{y \ell(1)npr-1 w f shi^{tsl}}{y^+ t200 w^+ f shi^{tsl}} \times \frac{ORE-R}{Y}$
 \downarrow 22°C

F₂ adultok száma : $\frac{404,54 \text{ g}}{0,0013 \text{ g}} = 311.185 \text{ db}$

Aberráns F ₂ legyek			U T Ó D - A N A L I Z I S				
Fenotípus	Elhullott	Élő	Partner szülő	U t ó	d o k	A szülő valószínű genotípusa	
$y^+ w f shi^{tsl} \text{ ♂}$	10	1	$\frac{Df(1)RA-19}{FM6\ell}$	$Df(1)RA-19/y^+ w f shi^{tsl} :$	9	ℓ^+ rekombináns : $y^+ \ell^+ w f shi^{tsl}/Y$	
				$y^+ w f shi^{tsl}/FM6\ell :$	9		
$y w f shi^{tsl} \text{ ♂}$	8	3 /1-3/	$\frac{Df(1)RA-19}{FM6\ell}$	$Df(1)RA-19/y w f shi^{tsl} :$	1. 2. 3. 0 0 0	Előzőleg X - Y nondiszjunkció : $y \ell(1)npr-1 w f shi^{tsl}/Y_y \ell^+$	
				$FM6\ell/y w f shi^{tsl} :$	0 0 18		
				$Df(1)RA-19/Y_y \ell^+ :$	0 0 20		
$y^+ w^+ f shi^{tsl} \text{ ♂}$	1021	-	$\frac{Df(1)RA-19}{FM6\ell}$	$Df(1)RA-19/y^+ w^+ f shi^{tsl} :$	1. 2. 3. 4. 5-15 0 0 19 0 0	1-2: $y^+ t200 w^+ f shi^{tsl}/Y$ "escaper" 3: $y^+ \ell^+ w^+ f shi^{tsl}/Y$ Dupla rekombináns? Gén konverzió? 4: $y^+ t200 w^+ f shi^{tsl}/Y_y \ell^+$ Előzőleg X-Y nondiszjunkció 5-15: steril hímek	
				$y^+ w^+ f shi^{tsl}/FM6\ell :$	29 55 17 15 0		
				$Df(1)RA-19/Y_y \ell^+ :$	0 0 0 15 0		
$y^+ w^+ f shi^{tsl} \text{ ♀}$	11	17 /1-5/	$\frac{Binsn}{Y}$	$y^+ w^+ f shi^{tsl} \text{ ♀} :$	1. 2. 3. 4. 5. 3 3 24 12 11	Anyai X - X nondiszjunkció : $\frac{y \ell(1)npr-1 w f shi^{tsl}}{y^+ t200 w^+ f shi^{tsl}} / Y$	
				$y^+ w^+ f shi^{tsl}/Binsn \text{ ♀} :$	77 16 1 54 111		
				$Binsn/Y :$	5 4 46 16 13		

val viszont nem. Ez arra utal, hogy az apa letális X-kromoszómát hordozott, tehát "escaper" volt. A 3. számú $y^+ w^+ f shi^{ts1}$ him a partner nőtény mindkét X-kromoszómájával adott nőtény utódot, tehát \underline{l}^+ X-kromoszómát hordozott. Figyelembe véve a marker-mutációk elhelyezkedését, a $y^+ \underline{l}^+ w^+$ kombináció csak kettős rekombináció eredménye lehet. Megjegyezzük, hogy a \underline{l}^+ egyedek génkonverzió "szülöttei" is lehetnek. Jelenleg nem tudjuk elkülöníteni a két lehetőséget.

F_2 -szelekciókor a himek mellett $y^+ w^+ f shi^{ts1}$ fenotípusu nőtényeket is találtunk. Binsn himekkel keresztezve, az utódok között Binsn himeket nyertem vissza. Mivel az anyákban nyilvánvalóan nem lehetett Binsn kromoszóma, az csak az apáktól jöhetett. Az Y-kromoszómát viszont valószínűleg az anyák hordozták (X/X/Y). A $y^+ w^+ f shi^{ts1}$ F_2 nőtények tehát X-X nondiszjunkcióval keletkeztek. Megjegyezzük, hogy $y^+ w^+ f shi^{ts1}$ nőtények az utódanalízisben is feltűntek, amely ismételt X-X nondiszjunkcióra utal.

b. Az $\ell(1)npr-1$ és $t81$ letális mutációk közötti távolság meghatározása

A transzheterozigóta nőtények előállítását és a kísérleti körülmények részletes leírását az a./ pontban már ismerttettem.

A keresztezés, amelyből a ritka genotípusu egyedeket szelektáltam, a következő volt :

F₁

$$\begin{array}{c}
 \text{♀} \frac{y \ \ell(1)npr-1 \ t81^+ w \ f \ shi^{ts1}}{y^+ \ \ell(1)npr-1^+ t81 \ w^+ f \ shi^{ts1}} \times \frac{y^+ \ \ell(1)npr-1^+ \ t81^+ \ w^+ \ f^+ \ shi^{ts1^+}}{Y \quad /ORE-R/} \text{♂} \\
 \downarrow \quad \quad \quad 22^\circ\text{C}
 \end{array}$$

$$\text{♀} \frac{y \ \ell(1)npr-1 \ t81^+ \ w \ f \ shi^{ts1}}{y^+ \ \ell(1)npr-1^+ t81 \ w^+ f^+ shi^{ts1^+}} ; \frac{\cancel{\ell(1)npr-1}}{\cancel{Y}} ; \text{♂}$$

F₂

$$\text{♀} \frac{y^+ \ \ell(1)npr-1^+ t81 \ w^+ f \ shi^{ts1}}{y^+ \ \ell(1)npr-1^+ t81^+ w^+ f^+ shi^{ts1^+}} ; \frac{\cancel{t81}}{\cancel{Y}} ; \text{♂}$$

· vad ♀ ♀

Ezen keresztezésben a szülői transzheterozigóta nőstények száma 12.000 db, az ORE-R hímek száma 4.600 db volt. Az F₂-ben az imágók mennyisége 164.180 db. /Meghatározása a már leírt módon történt./ A tömegszelekcióból kapott "aberránsokat" egyenként leellenőriztük az a./ pontban leírtak szerint, és az utódanalízisből a következő eredményeket nyertük /7. táblázat/:

A y⁺ w f shi^{ts1} fenotípusu hímeket keresztezve Df(1)RA-19/FM6 ℓ nőstényekkel, az utódok között csak nőstények keltek, amiből következik, hogy a szülői F₂-ből származó hímek y⁺ ℓ ⁺ w f shi^{ts1} genotípusúak, azaz egyszeres rekombinánsok /4 db/.

7. táblázat A $\ell(1)npr-1$ és $t81$ mutációk távolságának meghatározása

Keresztezés : $\frac{y \ell(1)npr-1 w f shi^{ts1}}{y^+ t81 w^+ f shi^{ts1}} \times \frac{ORE-R}{Y}$

↓ 22°C

F_2 adultok száma = $\frac{210,15 \text{ g}}{0,0013 \text{ g}} = 164.180 \text{ db}$

Aberráns F_2 legyek			U t ó d a n a l i z i s				A szülő valószínű genotipusa				
Fenotípus	Elhullott	Élő	Partner szülő	U	T	Ó D O K					
$y^+ w f shi^{ts1} \text{ ♂}$	3	4 /1;2;3;4./	<u>Df(1)RA-19</u> FM6 ℓ	<u>Df(1)RA-19</u>	1. 2. 3. 4.				ℓ^+ rekombináns : <u>$y^+ \ell^+ w f shi^{ts1}$</u> Y		
				<u>$y^+ w f shi^{ts1}$</u> FM6 ℓ	: 63	51	56	16			
$y^+ w^+ f shi^{ts1} \text{ ♂}$	12	6 /1.-6./	<u>Df(1)RA-19</u> FM6 ℓ	<u>Df(1)RA-19</u>	1. 2. 3. 4. 5. 6.				Kétszeres rekombináns + génkonverzió? <u>$y^+ \ell^+ w^+ f shi^{ts1}$</u> Y		
				<u>$y^+ w^+ f shi^{ts1}$</u> FM6 ℓ	: 54	98	23	32		17	18
$y^+ w^+ f shi^{ts1} \text{ ♀}$	0	14 /1.-3./	<u>Binsn</u> Y	<u>$y^+ w^+ f shi^{ts1}$</u> /Binsn	1. 2. 3.				Anyai X-X nondiszjunkció : <u>$y \ell(1)npr-1 w f shi^{ts1}$</u> ; Y <u>$y^+ t81 w^+ f shi^{ts1}$</u>		
				<u>$y \ell(1)npr-1 w f shi^{ts1}$</u> <u>$y^+ t81 w^+ f shi^{ts1}$</u>	: 43	83	98	: 5		7	4
				Binsn/Y	: 1	9	4				

A $y^+ w^+ f shi^{ts1}$ fenotípusu hímek keresztezéséből az utódokra az a./ pontban foglalt magyarázat érvényes, azaz a kitétellel, hogy a t200 helyett t81 mutáció szerepel /7. táblázat/.

A $y^+ w^+ f shi^{ts1}$ fenotípusu nőstényeknél a keresztezés és az utódok megoszlása ugyanaz volt, mint az a./ pontban, tehát ezek is X-X nondiszjunkcióval keletkeztek.

c. A t200 és t81 letális mutációk közötti távolság meghatározása

A keresztezésben a szülők számának aránya /nőstények - hímek/ kb.: 2:1 volt /9.500 db ♀ és 5.700 db ♂/. A kísérlet főbbi lépése az F_2 utódok felneveléséig azonos az a./ és b./ pontban leírtakkal. A kapott 562.896 db F_2 imágóból az egyszeres rekombináns /1 db/ és a többi élő aberráns legyet az előző kísérletek sémája szerint kereszteztem.

Az eredményeket a 8. táblázat foglalja magában, részletes magyarázatuk az a./ és b./ ponthoz hasonló.

A génsorrendet és a letális gének közötti távolságot az F_2 nemzedékben kelt adultok /nőstények/ számából és a rekombinánsok mennyiségéből számoltuk. A rekombináns hímek számát elvben a várható összes hím légy számához kell viszonyítani. Mivel azonban a letális mutációk a hímeket megölik, a megmaradó nőstények száma viszont azonos kell legyen a hímek számával, az előbbi használható vonatkozási alapként.

A génsorrendet és a távolságokat a 11./a és 11./b ábra szemlélteti.

8. táblázat A t81 és t200 mutációk távolságának meghatározása



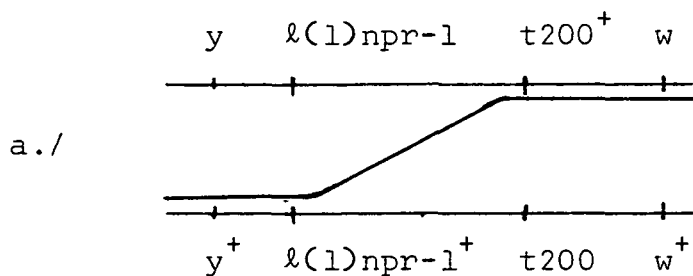
$$\text{Keresztezés : } \frac{y \ t81 \ w \ f \ shi^{ts1}}{y^+ \ t200 \ w^+ \ f \ shi^{ts1}} \times \frac{\text{ORE-R}}{Y}$$

↓ 18°C

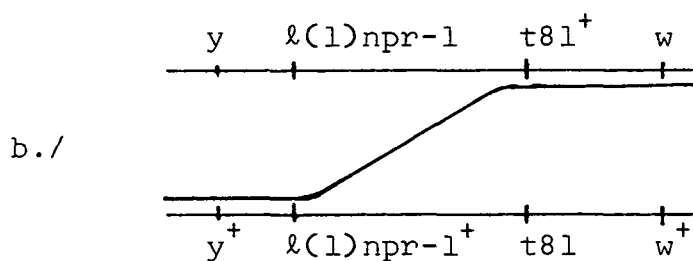
$$F_2 \text{ adultok száma} = \frac{731,76 \text{ g}}{0,0013 \text{ g}} = 562.896 \text{ db}$$

Aberráns F ₂ legyek			U t ó d a n a l i z i s																				
Fenotípus	Elhullott	Élő	Partner szülő	U t ó d o k	A szülő valószínű genotípusa																		
$y \ w^+ \ f \ shi^{ts1} \ \text{♂}$	8	0	-	---	Rekombináns? $y \ \ell^+ \ w^+ \ f \ shi^{ts1}/Y$																		
$y^+ \ w \ f \ shi^{ts1} \ \text{♂}$	2	0	-	---	Letális rekombináns - - "escaper"? $y^+ \ t200 \ w \ f \ shi^{ts1}/Y$																		
$y \ w \ f \ shi^{ts1} \ \text{♂}$	4731 shi^{ts1}		$\frac{Df(1)RA-19}{FM6\ell}$	<table border="1" style="width: 100%; text-align: center;"> <tr> <td></td> <td>1.</td> <td>2.</td> <td>3.</td> <td>4.</td> <td>5.-15.</td> </tr> <tr> <td>$\frac{Df(1)RA-19}{y \ w \ f \ shi^{ts1}}$</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>$\frac{y \ w \ f \ shi^{ts1}}{FM6\ell}$</td> <td>8</td> <td>4</td> <td>86</td> <td>64</td> <td>0</td> </tr> </table>		1.	2.	3.	4.	5.-15.	$\frac{Df(1)RA-19}{y \ w \ f \ shi^{ts1}}$	0	0	0	0	0	$\frac{y \ w \ f \ shi^{ts1}}{FM6\ell}$	8	4	86	64	0	"Escaper" : $y \ t200 \ w \ f \ shi^{ts1}/Y$
	1.	2.	3.	4.	5.-15.																		
$\frac{Df(1)RA-19}{y \ w \ f \ shi^{ts1}}$	0	0	0	0	0																		
$\frac{y \ w \ f \ shi^{ts1}}{FM6\ell}$	8	4	86	64	0																		

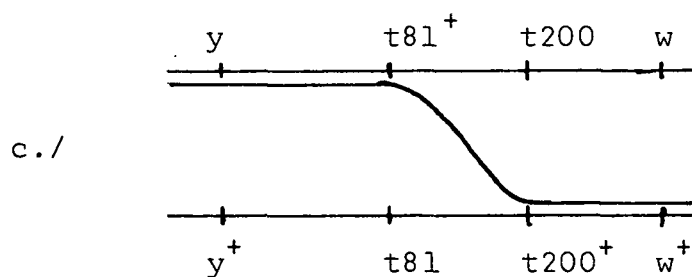
11./a ábra Génsorrend és térképtávolság a rekombinációs adatok alapján



$$\text{Rekombinációs \%} = \frac{11}{311.185} \times 100 = 0.0035$$

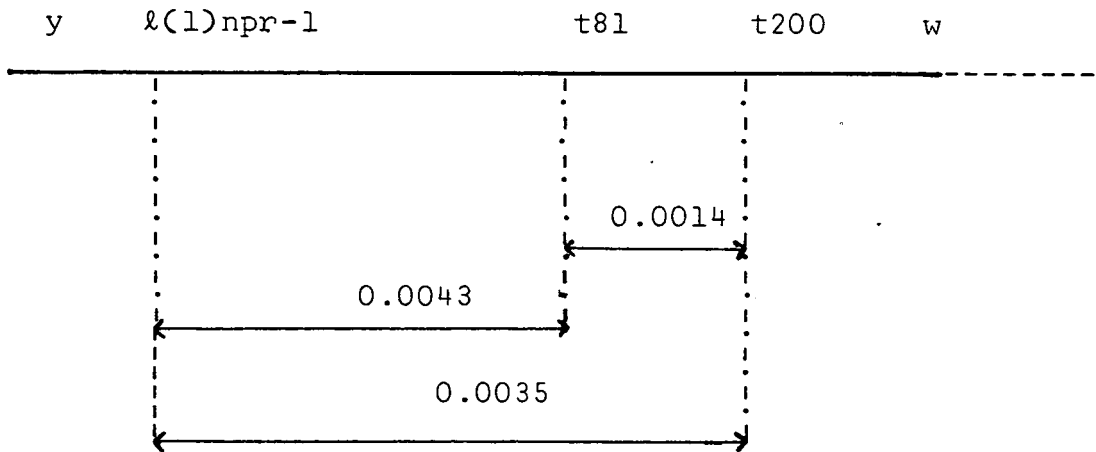


$$\text{Rekombinációs \%} = \frac{7}{164.180} \times 100 = 0.0043$$



$$\text{Rekombinációs \%} = \frac{8}{562.896} \times 100 = 0.0014$$

11./b ábra A vizsgált letális mutációk elhelyezkedése az X-kromoszómán



4. Duplikáció izolálása

Olyan kromoszóma átrendeződésre volt szükség, ahol a töréspont a komplex lokusz területére vagy közvetlen környezetébe esik, így a komplex lokuszt citológiaiilag pontosan lokalizálhatjuk, és adott "band"-hez rendelhetjük. Ilyen célra leginkább deléciókat igyekeznek izolálni, mi viszont azért döntöttünk a duplikáció izolálás mellett, mert itt elvben alkalmazható a tömegszelekciós módszer /lásd alább/.

Ilyen duplikációk nyeresére két kísérletet végeztünk. Alapelv mindkét esetben a következő volt :

himeket Röntgen sugárral kezeltünk. /1.000 R/perc, 150 kV, 5 mA, 0.5 mm Al szűrő/ Várható, hogy itt keletkeznek többek között olyan $\underline{\ell}^+$ duplikációk, amelyek nem hordozzák a $\underline{\text{shi}}^{\text{ts1}^+}$ allélt. A letális mutációt ebben az esetben úgy választjuk meg, hogy az X-kromoszóma csucsához közel, a komplex lokusztól /2B5/ disztálisan helyezkedjen el. Ez egyben a $\underline{\text{shi}}^{\text{ts1}}$ lokusztól is távol esik. Választásunk a $\underline{\text{t242}}$ mutánsra esett, amely mindkét feltételt teljesíti. Várható, hogy a $\underline{\text{t242}}^+$ duplikáció proximális töréspontja a komplex lokusz területére esik /ez utóbbi térképhelyzete: 0,43/, és ugyanakkor biztosan nem éri el a $\underline{\text{shi}}^{\text{ts1}}$ lokuszt /52,2/. A besugárzott himeket tehát olyan nőstényekkel kereszteztük, amelyek $\underline{\text{t242 shi}}^{\text{ts1}}$ kromoszómát hordoznak /12. ábra/. Az F_1 nemzedékben minden utód $\underline{\text{shi}}^{\text{ts1}^+}$ fenotípusu, mert az $\underline{\text{shi}}^{\text{ts1}}$ kromoszómát hordozó himeket $\underline{\text{t242}}$ mutáció megöli. Kivételt képeznek azon ritka egyedek, amelyek $\underline{\text{t242}}^+$ duplikációt hordoznak. Ezen hímek 29°C -on paralizálnak, így az előzőekben ismertetett tömegszelekciós módszerrel izolálhatók.

Az első kísérletben ORE-R $\underline{\ell}^+ \underline{\text{shi}}^{\text{ts1}^+}$ vad fenotípusu himeket sugároztunk be /12./a ábra/. A himeket két napon belül gyűjtöttük a 25°C -on fenntartott populációból. A heterozigóta nőstényeket ($\underline{\text{y t242 shi}}^{\text{ts1}}/\underline{\text{Binsn}}$) az adult állapotig 22°C -on nevelt populációból nyertük. A keresztezést populációs ládában 22°C -on végeztük, és az utódok felnevelése is 22°C -on történt. A petéző populációt 10 napon-

12. ábra

ℓ^+ duplikáció izolálása

a./

P ♀ $\frac{y \quad t242 \quad f \quad shi^{ts1}}{\text{Binsn}}$ x $\frac{y^+ \quad t242^+ \quad f^+ \quad shi^{ts1^+}}{Y}$ ♂ /ORE-R/

4.000 R

22°C

F₁ $\frac{y \quad t242 \quad f \quad shi^{ts1}}{y^+ \quad t242 \quad f^+ \quad shi^{ts1^+}}$; $\frac{\text{Binsn}}{y^+ \quad t242^+ \quad f^+ \quad shi^{ts1^+}}$; $\frac{\text{Binsn}}{Y}$; ~~$\frac{t242}{Y}$~~

b./

29°C-on paralizál

P ♀ $\frac{y \quad t242 \quad f \quad shi^{ts1}}{\text{FM6}\ell}$ x $\frac{y \quad t242^+ \quad f \quad shi^{ts1^+}}{Y\ell^+}$ ♂ / $\hat{X}Y$ ♂ /

4.000 R

22°C

F₁ $\frac{y \quad t242 \quad f \quad shi^{ts1}}{y \quad t242^+ \quad f^+ \quad shi^{ts1^+}}$; $\frac{\text{FM6}\ell}{y \quad t242^+ \quad f^+ \quad shi^{ts1^+}}$; / $X/\hat{X}Y$ ♀ /

$\frac{y \quad t242^+}{y \quad t242 \quad f \quad shi^{ts1}}$ / $X/Y\ell^+$ ♂ /

29°C-on paralizál

ként lecseréltük. A kikelt adultokat CO₂-os kábitás után lemértük, és az egyedszámot a már említett módon /lásd: Anyag és Módszer c. fejezet/ meghatároztuk. A 98.800 db F₁ utód közül tömegszelekcióval visszanyertük a shi^{ts1} variánsokat, összesen 365 db himet. A kapott himeket többször visszakeresztettük Binsn és FM6l balanszert hordozó t242 heterozigóta nőstényekkel. A keresztezésekből sterilitás és elhullás miatt végül csak 5 stabil duplikációs törzset nyertünk.

A duplikáció töréspontjának behatárolására a duplikációkat hordozó himeket a 2B5 régió mutánsaival kereszteltük. Egy ilyen keresztezést mutat be a 9. táblázat, a végső eredményeket pedig a 10. táblázat. Látható, hogy az öt duplikáció közül egyiknek a töréspontja sem esik a komplex lokusz területére.

A második kísérletben un. kapcsolt $\hat{X}Y$ -kromoszómát hordozó himeket sugároztunk be /12./b ábra/, az előzőekben alkalmazott dózissal, a következő elképzelésből kiindulva:

Amíg nincs redukciós osztódás, a spermatogonális őscsira-sejtben lehetőség van arra, hogy az X-kromoszóma megfelelő része az Y-kromoszómára transzlokálódjék, mivel egy sejtben belül van az X és Y-kromoszóma. A redukciós osztódást követően erre már nincs lehetőség, tehát a haploid spermiumokban esetleg képződő hasznos kromoszóma-átrendeződéseket elveszítjük, holott a spermiumok teszik ki a target-sejtek nagy többségét a besugárzás pillanatában. Ha $\hat{X}Y$ kapcsolt kromoszómát hordozó himeket választunk szülőnek, úgy min-

9. táblázat Y_{ℓ}^+ duplikáció* komplementációja t10 mutánssal

Keresztezés :

$$\begin{array}{c} \text{♀} \\ \hline y \quad t242^+ \quad t10 \\ \hline \text{FM6}\ell \end{array} \times \begin{array}{c} y \quad t242 \quad t10^+ \\ \hline Y_{\ell}^+ \\ \hline \text{♂} \end{array}$$

F ₁ UTÓDOK	
Genotipusa	Száma
$\frac{y \quad t242 \quad t10^+}{\text{FM6}\ell}$ ♀	68
$\frac{y \quad t242 \quad t10^+}{y \quad t242^+ \quad t10}$ ♀	65
$\frac{y \quad t242^+ \quad t10}{Y_{\ell}^+}$ ♂	46

* Dp(1)YSz 71/4

10. táblázat Az $Y_{\ell}+$ duplikációk komplementációja
letális mutáns törzsekkel*

Keresztezési partner ♀	Vizsgált $Y_{\ell}+$ duplikáció [†]				
	71/4	78/4	170	280	303
<u>t10</u> FM6 ℓ	+	+	+	-	+
<u>t35</u> FM6 ℓ	+	+	+	-	+
<u>t81</u> FM6 ℓ	+	+	+	-	+
<u>t99</u> FM6 ℓ	+	+	+	-	+
<u>t200</u> FM6 ℓ	+	+	+	-	+
<u>t242</u> FM6 ℓ	+	+	+	+	+
<u>$\ell(1)npr-1$</u> Binsn	+	+	+	-	+

*Rövidítések: + = $/Y_{\ell}+$ σ^{\uparrow} van az F_1 nemzedékben /komplementáció van/

- = $/Y_{\ell}+$ σ^{\uparrow} nincs az F_1 nemzedékben /komplementáció nincs/

[†]A vizsgált duplikációt y t242 f shi car/ $Y_{\ell}+$ hímek hordozták

dig együtt marad az X és Y kromoszóma. Feltehető, hogy a sugárzás hatására keletkeznek olyan variánsok, amelyekben az Y-kromoszóma megmarad, és az X kromoszómának a csucsi része kapcsolódik hozzá. Ezért alkalmaztuk a továbbiakban az $\hat{X}Y$ hímeket. /A keresztezési sémát a 12./b ábrára mutatja./

Kísérleteinkben több populációból, de mindig azonos keresztezésből gyűjtöttünk petéket. A heterozigóta nőstényeket /y t242 f shi^{ts1}/FM6l/ kereszteztük $\hat{X}Y$ sugárkezelt hímekkel. /Első kísérlet: 9960 db nőstény és 3600 db hím; második kísérlet: 13.634 db nőstény és 3160 db hím; harmadik kísérlet: 8426 db nőstény és 4434 db hím./ A petéző populációt, valamint az első két keresztezésből származó utódokat 22°C-on tartottuk, illetve neveltük fel. A harmadik kísérletet 18°C-on végeztük. Az F₁ kelés legyűjtése, egyedszám meghatározása és a szelektálás az Anyag és Módszer című fejezetben leírtak szerint történt. A szelektált legyek összmennyisége a három kísérletben 227.388 db, a visszanyert élő shi^{ts1} legyek száma 390 db hím, amelyek feltételezhetően duplikációt hordoztak /11. táblázat/. Ebből fertilis volt 235 db.

A töréspont genetikai behatárolását úgy végeztük el, hogy a duplikációt hordozó hímeket ismert letális mutációt hordozó nőstényekkel kereszteztük /12. táblázat/. A táblázatból látható, hogy a duplikáció nem nyulik be a komplex lokusz területére, hanem attól disztálisan helyezkedik el, a stubarista /sta/ és az o.c.c. csoport között. Ezt az eredményt kaptuk az összes tesztelt duplikációra nézve, amely a második kísérletből származott.

11. táblázat Duplikáció izolálás: besugárzott \hat{XY}
 hímek shi^{ts1} utódainak megoszlása

ts paralitikus F ₁ legyek			
Fenotípus		Élő adultok	Elhullott adultok
y f shi ^{ts1}	♂	390	16
y ⁺ f shi ^{ts1}	♂	1	-
y shi ^{ts1} /f/	♀	24 /+2/	-
y f shi ^{ts1} /f ⁺ shi ^{ts1}	♀	11	-



12. táblázat $\hat{X}Y$ hímekből származó duplikációk töréspontjainak vizsgálata*

$$\text{Keresztezés : } \text{♀} \frac{y \ell}{FM6} \times \frac{y \text{ t242 f shi}^{ts1}}{Y_{\ell}^{+}} \text{♂}$$

Letális mutáció a ♀ keresztezési partnerben	F_1 utódok		
	$\frac{y \ell}{Y_{\ell}^{+}}$	$\frac{y \text{ t242 f shi}^{ts1}}{y\ell}$	$\frac{y \text{ t242 f shi}^{ts1}}{FM6\ell}$
t242	+	-	+
t sta	+	+	+
$\ell(1)npr-1$	-	+	+
t4	-	+	+
t99	-	+	+
t81	-	+	+
t35	-	+	+
t10	-	+	+

*Mivel az összes duplikáció azonos utódmegoszlást adott, az Y_{ℓ}^{+} általános jelölést alkalmazzuk.

AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

1. Az általunk vizsgált letális gének a *Drosophila melanogaster* X-kromoszómájának disztális régiójában helyezkednek el a y /térképhelyzet: 0,00/ és w /térképhelyzet: 1,5/ recesszív mutációs pontok között. Tudjuk, hogy a letális allélek közül az o.c.c. csoport tagjai azonos lokuszban hibásak, amelynek genetikai térképhelyzetét az ℓ(1)npr-2 térképzeése adta meg: 0,46 /Belyaeva és mtsai., 1980/.

2. Az allélek egymáshoz képest várhatólag alacsony rekombinációs gyakoriságot mutatnak, ezért térképezésükhöz, a rekombinánsok visszanyeréséhez egy uj tömegszelekciós elvet és rendszert dolgoztunk ki, amely a shi^{ts1} mutáció által okozott hőérzékeny paralízis jelenségén alapszik.

Kidolgozott módszerünk előnye, hogy a *Drosophila melanogaster* X-kromoszómájának bármely szakaszára alkalmazható. Mivel a shi^{ts1} lokusz a centromérhez viszonylag közel van /térképhely: 52,2; Lindsley és Grell, 1968/, a módszer a tőle távolabb, disztálisan fekvő mutánsokra alkalmazható legkönnyebben. A tömegszelekciós módszer alkalmazásával nagyon kicsiny rekombinációs értékeket sikerült mérni az o.c.c. és a szomszédos gének között :
ℓ(1)npr-1 - t200 = 0,0035; ℓ(1)npr-1 - t81 = 0,0043;
t200 - t81 = 0,0014. A ℓ⁺ rekombinánsokat a y w/y⁺ w⁺ marker-párok közötti egyszeres rekombináció alapján

$\underline{y} \underline{w}^+$ vagy $\underline{y}^+ \underline{w}$ azonosítottuk. Minden esetben megkaptunk azonban olyan \underline{x}^+ him egyedeket is, amelyekben a \underline{x}^+ X-kromoszóma a szülői markereket $\underline{y}^+ \underline{w}^+$ vagy $\underline{y} \underline{w}$ hordozta /6., 7. és 8. táblázatok/. Ezek elvben keletkezhetnek kettős rekombináció útján, ezt a lehetőséget azonban kevésbé valószínűsíti az a tény, hogy a mért kicsiny távolságokhoz képest az ilyen egyedek száma túlságosan magas kettős rekombinációs gyakoriságot jelentene. Ilyen egyedek keletkezése génkonverzió útján is elképzelhető. Génkonverzióknak nevezzük azt a jelenséget, amikor két, egymáshoz igen közeli mutáns allél egyike átalakul a másikká, anélkül, hogy ugyanakkor a "normális" rekombinációnál megszokott reciprok átalakulás is végbemenne. A génkonverzió a kétoldali marker-mutációk /"flanking marker"/ kicserélődésétől is független, tehát gyakran "mimeli" a kettős rekombináció végeredményét. Génkonverziót *Drosophila melanogaster* esetében is leírtak, illetve részletesen tanulmányozták az ún. "fél-tetrád-analízis" segítségével /Finnerty, 1976; Carlson, 1971/. Mivel esetünkben a reciprocitás vizsgálata nem lehetséges, a szülői markerkombinációt hordozó \underline{x}^+ X-kromoszómák keletkezése kettős rekombináció, illetve génkonverzió útján egyaránt feltételezhető.

A rekombinánsok szelektálása során egyéb "aberráns" legyeket is izoláltunk: egyrészt $\underline{y}^+ \underline{w}^+ \underline{f} \underline{shi}^{ts1}$ nőstényeket, másrészt gynander mozaikos állatokat /6., 7. és 8. táblázat/. Az előbbi nőstények fenotípusa maternális volt; utódanalízisük egyrészt bizonyította, hogy az X-kro-

moszómák továbbra is hordozták a letális mutációkat, és melléjük egy Y-kromoszóma is került, másrészt az utódnemzedékek során gyakori az X-X, bizonyos esetekben pedig az X-Y nondiszjunkció. Mindez arra utal, hogy a $y^+ w^+ f shi^{ts1}$ nőstények nondiszjunkcióval keletkeznek.

A gynander mozaikos állatok eredete spontán kromoszómavesztésre vezethető vissza. Ha egy eredetileg $\lambda f shi^{ts1}$ /ORE-R állat egyik sejtjéből az embrionális fejlődés elején elvész a $\lambda^+ f^+ shi^{ts1+}$ /ORE-R/kromoszóma, az egyed mozaikossá válik a shi^{ts1} jellegre, és 29°C-on részben megbénul. Csökkent mozgásképeségük alapján a szelektorból visszanyerhetjük az ilyen mozaikokat.

A tömegszelekciós rendszert új X;Y transzlokációk izolálására is alkalmaztuk. A transzlokációs frekvenciát Röntgen-besugárzással emeltük. Első kísérletünkben ORE-R hímeket sugároztunk be, amelyek vad típusu X és Y-kromoszómát hordoztak. E kísérleti megközelítés kritikájaként annyit mondhatunk, hogy ebben az esetben a X;Y transzlokációk csak az őscsírasejtekben képződhetnek, ahol a két kromoszóma még egyazon sejtben van együtt. Az őscsírasejtek száma viszont sokkal kisebb, mint a differenciálódott spermiumok száma, amelyekben viszont vagy csak X, vagy csak Y-kromoszóma található. Spermiumokban tehát csak X→ autoszóma transzlokációk vagy deléciós kromoszómák képződhetnek. A transzlokáció két tagja csak akkor válhat szét egymástól, ha az egyik kellően kicsiny kromoszómadarabot hordoz; az ilyen, párjától elválasztott kromoszómadarabot nevezik duplikációnak. Elvben X→ autoszóma duplikációk kelet-

kezése is várható, azonban ilyet **nem** találtunk.

A Röntgen-indukálta deléciók közül azokat nyerhetjük vissza, amelyek a besugárzott kromoszómából kiejtik a shi^{ts1} lokuszt. Ez azonban nagyon távol van a 2B5 régiótól, tehát az olyan deléció, amely mindkettőt érinti, igen nagy kell legyen. A nagy deléciót hordozó X-kromoszómát un. "free element"-nek nevezik; ez általában olyan kicsi, hogy ha az F₁ utódban egy másik X-kromoszóma mellé kerül, az egy X-et hordozó hímé fejlődik, ez azonban sterilis. Hiába izoláljuk tehát az ilyen hímeket, utódot nem kapunk tőlük, vagyis a "free element" elvész. Ez lehet a magyarázata annak, hogy az első kísérletben kapott shi^{ts1} hímek legnagyobb része sterilnek bizonyult /12./a ábra/.

Ezután tértünk át az XY kapcsolt kromoszóma használatára. Ebben az esetben a shi^{ts1}-t és a 2B5 régiót egyszerre érintő nagy deléció eltávolítja ugyan az X-kromoszóma legnagyobb részét, de a maradék kapcsolva marad az Y-kromoszómához, és így egyenértékűvé válik egy X;Y duplikációval. Mivel a kapcsolt XY a spermiumokban is együtt van, az itt indukált duplikációk is visszaizolálhatók, mert az Y-kromoszóma jelenléte az utód hímeket fertilissé teszi. A második kísérletből összesen 280 db fertilis X;Y duplikációt nyertünk vissza /11. táblázat/, ezek azonban a genetikai jellemzők azonosnak bizonyultak: a töréspont mindegyikben a sta és o.c.c. lokuszok között helyezkedik el /12. táblázat/. Ennek a legvalószínűbb magyarázata az, hogy az XY törzsben már a besugárzás előtt spontán módon képződött ez a duplikáció, és így ezt a tömeges

keresztezésben használt hímek egy része már hordozta. Ezt izoláltuk volna vissza sok példányban. Egy másik lehetőség az, hogy a sta és o.c.c. között az X-kromoszóma sokkal gyakrabban törik a statisztikai átlagnál /un. "hot spot" lenne itt/. Ebben az esetben várható, hogy a töréspont a sta - o.c.c. régióon belül mégsem ugyanaz. Ezt a lehetőséget egyelőre nem vizsgáltuk. Időközben előkísérleteket végeztünk egy olyan XY vonallal, amit ellenőrzött pártenyészetből indítottunk. /Ezeket az eredményeket a disszertáció nem tartalmazza./ Az első utódgeneráció hímjeiben ilyen spontán duplikációt nem találtunk. Négy-öt generációval később az XY hímeket a duplikáció-izoláláshoz alkalmazott keresztezésbe vittük /12. ábra/, de besugárzás nélkül. Az utódok között számos X;Y duplikációt találtunk, amelyek töréspontja ugyancsak a sta és o.c.c. között van, az utódanalízis alapján. Ez a kontrollkísérlet mindenképpen a spontán duplikáció hipotézisét támogatja.

Meg kell említenünk a munkánk folyamán észlelt vagy logikailag ki nem zárható hibalehetőségeket is, amelyek a tömegszelekciós rendszerrel kapcsolatosak. Kísérleteinkben az adult állapotig fel kell nevelni az utódokat az értékeléshez. A shi^{ts1} mutánsok természetéből adódik, hogy bár a mutáns egyedek 22°C-on normálisan viselkednek és fejlődnek, ezt meghaladó hőmérséklet már károsan befolyásolja mozgás- és életképességüket. Lokális hőmérsékletingadozást - emelkedést - okozhat pl. a táptalajban fejlődő lárvák kívántnál magasabb száma. Az sem kizárt, hogy túl nagy egyed-

sűrűség esetén az egyébként gyengébb, érzékenyebb shi^{ts1} mutáns lárvák háttérbe szorulnak a táplálkozás tekintetében. El kell kerülni a tenyészetek tulzsufoltságát; Petri-csészénként számítva néhány száz F₁ utód tűnik optimálisnak. Különösen fontos ez a szempont pl. finomtérképezéskor, ahol lényeges a kvantitatív eredmények megbízhatósága.

IRODALOMJEGYZÉK

- Ashburner, A. /1972/b/ Puffing patterns in *Drosophila melanogaster* and related species. Developmental studies on Giant Chromosomes /W. Beerman,, ed./ Results and Problems in Cell Differentiation. vol. 4. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 101-152.
- Ashburner, M., Richards, G. /1976/ The role of ecdysone in the control of gene activity in the polytene chromosomes of *Drosophila*. Insect Development /P.Lawrence, ed./ Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, Edinburgh, Victoria, 203-225.
- Beljajeva, E.S., Ajzenzon, M.G., Iljina, O.V., Zsimulev, I.F. /1978/ Citogenetyicseszki analiz puffa i rajonye 2B1-10 X-hromoszomü *Drosophila melanogaster*. Dokl. Akad. Nauk., Sz.Sz.Sz.R., 240, 1219-1222.
- Belyaeva, E.S., Aizenzon, M.G., Semeshin, V.F., Kiss, I., Koczka, K., Baritcheva, E.M., Gorelova, T.D., Zhimulev, I.F. /1980/ Cytogenetic Analysis of the 2B3-4 - 2B11 Region of the X-Chromosome of *Drosophila melanogaster*. Chromosoma /Berl./ 81, 281-306.
- Carlson, P.S. /1971/ A genetic analysis of the rudimentary locus of *Drosophila melanogaster*. Genet. Res. Camb., 17, 53-81.



Chovnick, A., Gelbart, W., McCarron, M. /1977/ Organization of the Rosy Locus in *Drosophila melanogaster*. Cell, vol. 11, 1-10.

Clever, U., P. Karlson /1960/ Induktion von Puff-Veränderungen in den Speicheldrüsenchromosomen von *Chironomus tentans* durch Ecdyson. Exp. Cell Res., 20, 623-626.

Finnerty, V. /1976/ Genetic units of *Drosophila* - Simple cistrons. In: The Genetics and Biology of *Drosophila* 1b /M.Ashburner and E.Novitski, eds./ 721-765.

Finnerty, V. /1976/ Gene Conversion in *Drosophila*. The Demonstration of Gene Conversion. In: The Genetics and Biology of *Drosophila* /M.Ashburner, E.Novitski, eds./ 333-340.

Garen, A., Garen, S. /1963/ Complementation in vivo between structure mutants of alkaline phosphatase from *E.coli*. J. Molec. Biol., 7, 13-22.

Gersh, E.S. /1975/ Sites of gene activity and of inactive genes in polytene chromosomes of Diptera. J. Theor. Biol., 50, 413-428.

Grigliatti, T.A., Hall, L., Rosenbluth, R., Suzuki, D.T. /1972/ Temperature-Sensitive Mutations in *Drosophila melanogaster*. Molec. Gen. Genet., 120, 107-114.

Judd, B.H. /1976/ Genetic units of *Drosophila* - Complex loci.
In: The Genetics and Biology of *Drosophila* lb /M.Ashburner
and E.Novitski, eds./ 768-799.

Kiss, I., Bencze, G., Fekete, É., Fodor, A., Gausz, J., Ma-
r6y, P., Szabad, J., Szidonya, J. /1976/a/ Isolation and
characterization of X-linked lethal mutants affecting
differentiation of the imaginal discs in *Drosophila mela-
nogaster*. Theor. Appl. Genet., 48, 217-226.

Lewis, F.B., Bacher, F. /1968/ Method of feeding ethyl-
-methansulfonate /EMS/ to *Drosophila* males. Dros. Inf.
Serv., 43, 193.

Lindsley, D.L., Grell, E.H. /1968/ Genetic Variations of
Drosophila melanogaster. Carnegie Institution of Washing-
ton Publication. No. 627.

Stewart, M., Murphy, C., Fristrom, J.W. /1972/ The recove-
ry and preliminary characterization of X-chromosome mu-
tants affecting discs of *Drosophila melanogaster*. Dev.
Biol., 27, 71-83.

FÜGGELÉK

1. A használt rövidítések és szimbólumok jelentése

<u>βE</u>	béta-ekdizon
<u>Binsn</u>	<u>B</u> és <u>sn</u> mutációkat és többszörös inverziót hordozó un. "balanszer" /rekombinációt gátló/ X-kromoszóma
<u>cv</u>	" <u>crossveinless</u> "; marker-mutáció az X-kromoszómán, amely a szárny keresztvénáinak hiányát okozza /térképhely : 13,7/
<u>Df(1)RA-19</u>	Y-kromoszómára transzlokálva van az X-kromoszóma 1F - 2B11 régiót is magába foglaló szakasza, valamint <u>y</u> marker-mutáció. X-kromoszóma 1F - 2B11-ig terjedő régióra deficiens és hordozza <u>v</u> marker-mutációt.
<u>Dpy²y67g</u>	<u>y²</u> marker-mutációt és a 2B1-10 régió génjeinek vad típusu alléljeit hordozó X;Y duplikáció
<u>ec</u>	" <u>echinus</u> "; a szem morfológiáját és felszíni mintázatát befolyásoló marker-mutáció az X-kromoszómán /térképhely : 5,5/

- E ekdizon /vedlési hormon/
- f "forked"; a normálisnál rövidebb, kettéágazó vagy horogszerű meggörbitett szőröket okozó marker-mutáció az X-kromoszómán /térképhely: 56,7/
- FM6 ℓ y², B és letális mutációt hordozó, un. "balanszer" X-kromoszóma
- $\text{\textcircled{f}}$ "gynander" mozaikos egyed, teste XX, illetve X0 /nőstény és him/ fenotipusu sejtekből épül fel, X-kromoszómavesztéssel képződik
- ℓ (1) "lethal"; letális mutáció az X-kromoszómán
- maroon-like a szemszint és a Malpighi tubulusok morfológiáját befolyásoló marker-mutáció az X-kromoszómán /térképhely : 64,8/. Egyszerre 3 enzim aktivitását szünteti meg.
- npr "non-pupariating"; normál lárvális fejlődésű, de a pupáriumképzésben és az azt követő metamorfózisban gátolt letális mutánsok

- d.norm "discs normal"; a vad típusét megközelítő vagy azzal azonos nagyságu és morfológiájú, imágókorongokkal rendelkező letális mutánsok
- o.c.c. "overlapping complementation complex"
- ORE-R "original" /eredeti/; vad populáció
- sc "scute"; a nagy érzékszőrök elvesztését okozó marker-mutáció az X-kromoszómán /térképhely : 0,0/
- shi^{ts} "shibire" /paralizáló/; hőmérséklet érzékeny, 29 °C-on mozgásképtelenséget okozó marker-mutáció az X-kromoszómán /térképhely : 52,2/
- sn "singed"; "perzselt" szőralakot okozó marker-mutáció az X-kromoszómán /térképhely : 21,0/
- v "vermilion"; skarlátvörös szemszint okozó marker-mutáció az X-kromoszómán /térképhely : 33,0/
- w "white"; a szemben és a Malpighi-edényekben teljes pigmenthiányt okozó marker-mutáció az X-kromoszómán /térképhely : 1,5/

y "yellow"; a normálisnál jóval világosabb /"sárga"/ test- és szőrszint okozó marker-mutáció az X-kromoszómán /térképhely : 0,0/

y² A normálisnál jóval világosabb /"sárga"/ testszint és normális színű szőröket és sertéket okozó marker-mutáció az X-kromoszómán /térképhely : 0,0/

Y Y-kromoszóma

Y_ℓ⁺ a ℓ⁺ vad típusu allélt hordozó X;Y duplikáció az Y-kromoszómán

XX "attached"; két X-kromoszóma a centromérjüknél összekapcsolva, amely a keresztezések során együttmarad

XY Egy Y és egy X-kromoszóma összekapcsolva a centromérjüknél, amely a keresztezések során megmarad

2. Lewis-féle táptalaj acetmuslica tenyésztésére

Összetétele: kukoricaliszt 76 g; élesztő 41 g; cukor 72 g; glükóz 24 g; CaCl_2 0,5 g; agar 8,9 g; víz 100 ml. Az alkotórészeket a cukor, a glükóz és az előduzzasztott agar kivételével felfőzzük. Előbbieket a főzés végén adjuk hozzá. Amikor a kész táptalaj kb. 45°C -ra hült le, 8,9 g propionsavat és 5,3 ml foszfor-savat keverünk bele, majd üvegekbe osztjuk szét.

3. Letális mutációk térképezése az ecetmüslicá X-kromoszómáján

Az X-kromoszóma térképezésekor heterozigóta nőstények F_1 him utódait értékeljük, amelyekben a rekombináció eredménye azonnal megnyilvánul.

A térképhelyzet meghatározásakor két kérdésre kell választ adni :

1. Melyik két marker-gén között helyezkedik el a térképezendő letális gén?

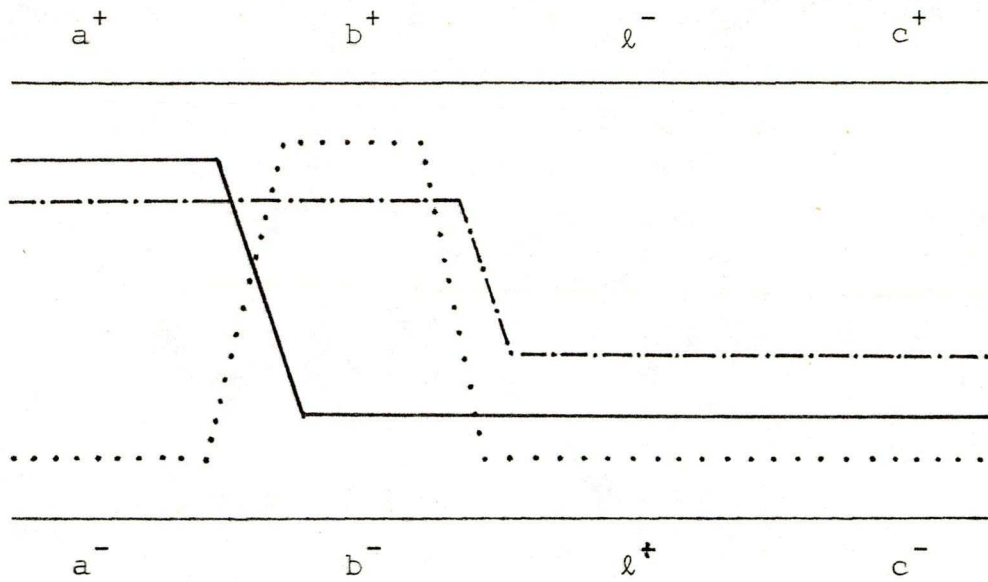
2. Mekkora a rekombinációs gyakoriság a letális gén és a szomszédos markerek között?

1. A gének sorrendjét a hárompontos teszt segítségével

állapítjuk meg. Mivel az F_1 hímek között csak a \underline{l}^+ egyedek jelennek meg, az egyik "pont" a \underline{l}^+ allél, a másik kettő pedig bármelyik két marker-mutáció /a és b, illetve b és c/. A \underline{l}^+ vagy a vizsgált marker-páron kívül /A. ábra/ vagy közöttük /B. ábra/ helyezkedik el. $a^+ b^+ \bar{l} c^+$ és $a^- b^- l^+ c^-$ a heterozigóta φ kromoszómái /1/, /2/,

/3/ és /4/ pedig az F_1 him utódokban megfigyelhető kromoszómák. /2/ és /3/ egyszeres, /4/ kétszeres rekombinációval keletkezik, vagyis /4/ lesz a legritkábban előforduló. Ennek alapján eldönthető, hogy a vizsgált 3 gén közül melyik van középen.

A./ Vizsgált markerek : a és b

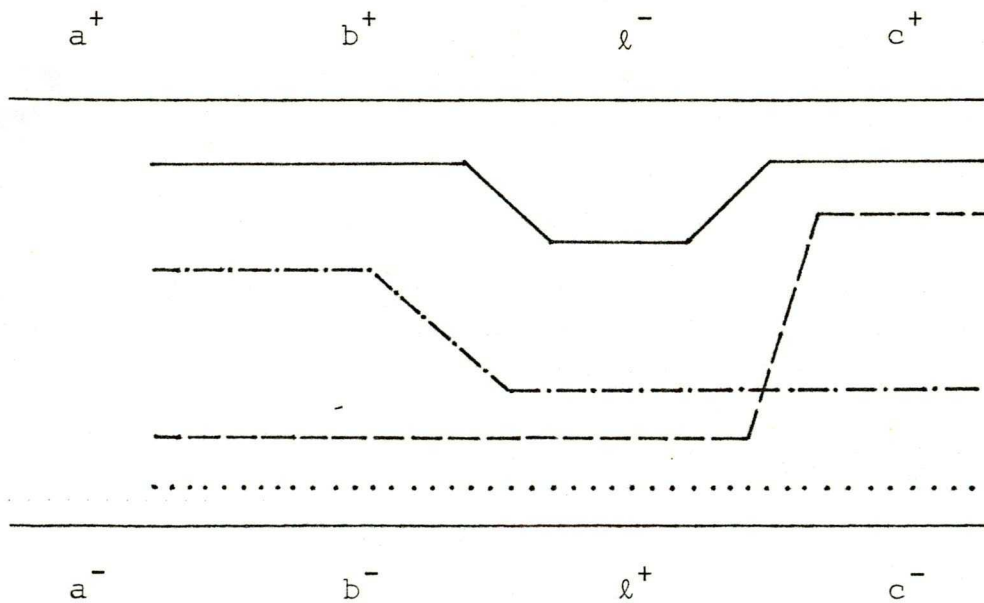


$F_1 \sigma^{\uparrow}$ kombinációk gyakorisága :

- /1/ $a^- b^- l^+$ > /2/ $a^+ b^- l^+$ — >
 /3/ $a^+ b^+ l^+$ — > /4/ $a^- b^+ l^+$

Sorrend : a - b - l

B./ Vizsgált markerek : b és c



F₁ ♂ kombinációk gyakorisága :

/1/	b ⁻	ℓ ⁺	c ⁻	>	/2/	b ⁻	ℓ ⁺	c ⁺	----	>
/3/	b ⁺	ℓ ⁺	c ⁻	>	/4/	b ⁺	ℓ ⁺	c ⁺	----	>

Sorrend : b - ℓ - c

2. A letális gén és a szomszédos marker-gének távolságát a kétpontos teszt segítségével határozzuk meg. Az egyik pont a ℓ⁺ allél, a másik b⁻, illetve c⁻. A rekombinációs százalék :

$$\underline{b} - \underline{\ell} \text{ távolság : } \frac{(b^+ \ell^+)}{(b^- \ell^+) + (b^+ \ell^+)} \times 100$$

$$\underline{c} - \underline{\ell} \text{ távolság : } \frac{(c^+ \ell^+)}{(c^- \ell^+) + (c^+ \ell^+)} \times 100$$