

Vad típusu és mutáns *Drosophila melanogaster*
lárvális szöveteinek metamorfózisa in vitro
kulturákban

Doktori értekezés

Irta:

Molnár Ilona

Készült:

Magyar Tudományos Akadémia
Szegedi Biológiai Központ
Genetikai Intézet

S z e g e d

1 9 8 0.



KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A dolgozatom alapjául szolgáló kísérleteket az MTA Szegedi Biológiai Központ Genetikai Intézetének Rovargenetikai csoportjában végeztem.

Köszönetemet fejezem ki Dr. Alföldi Lajosnak az SZBK és a Genetikai Intézet igazgatójának, aki lehetővé tette számomra, hogy itt dolgozzam.

Köszönettel tartozom Dr. Kiss Istvánnak, a Rovargenetikai csoport vezetőjének, munkám irányításáért és sokoldalú támogatásáért.

Köszönetet mondok a Rovargenetikai munkacsoport minden tagjának, a munkám során tanúsított érdeklődésért és tanácsaikért.



TARTALOMJEGYZÉK

	Oldal
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	
BEVEZETÉS	1.
1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	3.
1.1. A Kétszárnyuak metamorfózisa	3.
1.2. A hormonok szerepe a rovarok egyedfejlődésében	9.
1.3. A rovar szövettenyésztés fejlődése és jelentősége	13.
2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	17.
2.1. A felhasznált állatok	17.
2.2. Steril tenyészetek indítása és fenntartása	18.
2.3. Szervkulturák készítése	20.
2.4. A szervek fenntartására használt táploldatok	22.
2.5. A kulturák értékelése	23.
3. EREDMÉNYEK	24.
3.1. A vad típusu szövetkulturák β -ekdizon nélküli táptalajban	24.
3.2. Vad típusu szövetkulturák 1 $\mu\text{g/ml}$ β -ekdizon jelenlétében	25.
3.3. Mutáns szövetek β -ekdizon nélkül ...	32.

	Oldal
3.4. Mutáns szövetek β -ekdizon jelenlétében	36.
3.5. A lárvális kutikula tannelése és szklerotizációja 70% O ₂ atmoszférában	37.
3.6. Az N-acetil-dopamin hatása a lárvális kutikulára	42.
4. AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA	45.
4.1. Az in vitro rendszer	45.
4.2. A nem bábozódó és későn bábozódó mutáns szövetek viselkedése az in vitro rendszerben	49.
4.3. A lárvális kutikula tannelését befolyásoló tényezők	51.
5. ÖSSZEFOGLALÁS	55.
6. IRODALOMJEGYZÉK	57.

BEVEZETÉS

A rovarok egyedfejlődését olyan változások sorozata jellemzi, amelynek során a táplálkozásra és növekedésre specializálódott lárva szaporodásra képes imágóvá alakul. Ez a teljes átalakulással fejlődő rovarok esetében /Holometabolák/, a bábállapot alatt, a metamorfózis során történik meg. Ezeket a genetikailag meghatározott metamorfotikus változásokat a hormonmilió megváltozása idézi elő és ugyanarra a jelre a lárvális és az adult jellegű szövetek más-más választ adnak, determináltságuknak megfelelően.

A Diptera rendbe tartozó Drosophila melanogaster genetikai szempontból talán a legjobban ismert többsejtű eukarióta szervezet, generációs ideje viszonylag rövid /10 nap/ és tenyésztése is egyszerű, ezért igen alkalmas objektum a fejlődésgenetikai vizsgálatok céljára.

A metamorfózis szabályozásában döntő szerepet játszó géneket a különböző lépésekben hibás mutánsok tanulmányozása útján ismerhetjük meg. Erre igen alkalmasak azok a mutánsok, amelyek későn, vagy egyáltalán nem bábozódnak be. A Szegedi Biológiai Központ Rovargenetikai Csoportjában számos kései lárva - korai báb

letális mutánst izoláltak /Kiss és mtsai, 1976, 1978/, ezek pupáriumot nem képeznek, tehát már a metamorfózis bevezető lépésében hibásak.

Alapvető kérdés az, hogy ez a gátlás a metamorfózis további lépéseire is kiterjed-e? Lényeges azt tudnunk, hogy a mutáns gén melyik szövetben működik, és milyen hatása van az egyéb szövetekre, illetve az egész állatra. Ennek eldöntésére több módszer áll rendelkezésünkre, pl. genetikai mozaikok /Sturtevant, 1929/, transzplantáció /Ephrussi, Beadle, 1936/, in vitro szervtenyésztés.

Célul tűztem ki, egy olyan in vitro szervtenyésztési módszer kidolgozását, amely alkalmas a metamorfózisban gátolt mutánsok jellemzésére és a mutáció autonómiájának eldöntésére. Meg kellett vizsgálnunk, hogy a metamorfózis gátlását a vedlési hormon hiánya, illetve csökkent termelése okozza-e, és e gátlás megszüntethető-e a β -ekdizon mesterséges adagolásával. Disszertációm tárgya egy új típusú szervtenyésztési módszer kidolgozása és annak alkalmazása a vad típusú és mutáns szövetek hormonválaszának vizsgálatára.

1. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1.1. A Kétszárnyuak metamorfózisa

A Diptera rendbe tartozó rovarok egyedfejlődésének egyes lépései jól elkülöníthetők, életciklusuk négy szakaszból áll: embrió - lárva - báb - imágó. A Drosophila melanogaster esetében optimális körülmények között 25°C-on, az embrionális állapot kb. 1 napig, a lárvális fejlődési szakasz pedig 4 napig tart, és három stádiumból áll, melyeket vedlések választanak el egymástól. A harmadik stádium végén a lárva beszünteti a táplálkozást és előbábót /pupárium, tonnabáb/ képez. Ezen belül, a környezettől elszigetelten játszódnak le a metamorfotikus folyamatok. A megtermékenyítéstől számított 10. napon a lárváétól jelentősen különböző testfelépítésű imágó bujik ki a bábtokból.

A lárvális és az adult jellegű strukturák össejtjei már a fejlődés korai szakaszában, az embrió blaszto-derma stádiumában elkülönülnek egymástól, és ettől kezdve sorsuk is eltérő. A lárvális szervek az embrióban differenciálódnak, sejtjeik a lárvális élet során tovább már nem osztódnak, bár a DNS sorozatos endoreplikációja útján /az idegrendszer kivételével/ politenizálódnak. Az imaginális szervkezdemények a lárvális élet alatt végig megőrzik embrionális, differenciálatlan jel-



legüket, folyamatosan osztódnak és diploidok maradnak /Anderson, 1972/. A metamorfózis során a Malpighi-tubulusok, a háti-edény és az idegrendszer lényegében változatlanok maradnak, a lárvális szövetek hisztolizálnak, az imaginális szervkezdemények pedig növekedésnek indulnak és differenciálódni kezdenek /Bodenstein, 1950/.

1.1.1. A pupáriumképzés

A metamorfózis bevezető lépése a pupáriumképzés, amelynek során a lárva összehúzódik, majd ezzel egyidőben a kutikula szelvényezettsége fokozatosan kisimul és kialakul a jellemző alakú puparium /tonnabáb/. Az így létrejött bábok hamarosan megkeményednek /szklerotizáció/ és megbarnul /"tanning"/ /Zdarek és Fraenkel, 1972/.

A kitinből és kutikuláris fehérjékből álló kutikulát a lárvális epidermiszsejtek választják ki. E lárvális kutikula szklerotizációjának és tannelésének biokémiai mechanizmusával Karlson és Sekeris foglalkozott részletesen /Karlson és Sekeris, 1964/.

A kutikula megkeményedését, egyben szilárdságát és oldhatatlanságát a fehérjeláncok között orto-difenolos vegyületek által kialakuló térhálós szerkezet okozza. Ez a vegyület az N-acetil-dopamin, s bioszintézisét a Calliphora erythrocephalán végzett kísérletekkel derítették ki. Az N-acetil-dopamin a tirozinből képződik, a tirozin → DOPA → dopamin → N-acetil-dopamin sorrend-

nek megfelelően. A tirozin \rightarrow DOPA átalakítást a hemolimfában inaktív formában mindig jelen lévő tirozináz enzim végzi. A reakciósor kulcsenzimje a DOPA \rightarrow dopamin átalakítást végző dopa-dekarboxiláz, amely közvetlenül a pupáriumképzést megelőzően, hormonhatásra termelődik az epidermiszsejtekben. A dopamint acetiláló enzimet Maranda és Hodgetts /1977/ azonosították.

Az N-acetil-dopamint az epidermiszsejtek közvetlenül a kutikulába választják ki, ahol az epikutikulában lévő polifenoloxidázok aktiválják és a fehérje oldalláncok közötti keresztkötések létrehozására alkalmassá teszik /Andersen, 1974/.

Karlson feltételezése szerint az N-acetil-dopamin aromás gyűrűjén keresztül létesít kovalens kötést a fehérjemolekulák szabad aminocsoportjai között. A folyamat közben keletkező kincidális strukturák fényelnyelésével magyarázható a kutikula szklerotizációjával párhuzamosan történő barnulás.

Andersen szerint az N-acetil-dopamin nem csak az aromás gyűrűn, hanem az oldallánc β -szénatomján keresztül is kialakíthat keresztkötéseket a fehérjemolekulák között / β -szklerotizáció/. E feltételezését a radioaktívan jelzett N-acetil-dopaminnal végzett kísérletei támasztják alá /Andersen, 1974, 1979/. A β -szklerotizációhoz is szükséges az N-acetil-dopamin aktiválása, ennek mechanizmusa azonban még ismeretlen. Andersen feltételezi, hogy az aktiválást vég-

zõ enzimek már a nem szklerotizált kutikulában is jelen vannak, az epikutikulában oldhatatlanul kötve /ahonnan csak tripszines emésztéssel tehetők szabaddá/.

Tehát a lárvális kutikulában minden készen áll a szklerotizációhoz, csak az N-acetil-dopamin hiányzik. A β -ekdizon éppen az által indukálja a kutikula barnulását és szklerotizációját, hogy megindítja az N-acetil-dopamin termelést az epidermisz sejtekben.

1.1.2. Az adult kültakaró kialakulása

A pupáriumképzés után a lárvális epidermisz /az endokutikula legbelső rátapadó rétegével együtt/ levál a megkeményedett és megbarnult exo-kutikuláról. /A folyamatot gyakran - helytelenül - prepupális vedlésnek nevezik./ Ezután indul meg a tulajdonképpeni bábozódás, amikor a feji és tori imágókorongok differenciálódni kezdenek. Ezek kitürődésével létrejönnek az epidermális függelékek /szem,- antenna, láb, szárny, billér/, másrészt az imágókorongokból származó epidermiszsejtek bevonják a fej és a tor egész felszínét is. A politén lárvális epidermiszsejtek a testüregbe lökődnek és hisztolizálnak. Eközben történik meg a bábvedlés /pupális vedlés/, amelynek eredménye a vékony, struktura nélküli bábkutikula kiválasztása, amit a fejen és a toron az adult, az abdomenen még a lárvális epidermiszsejtek végeznek. A pupális vedlés után az abdominális hisztoblasztok is gyors szaporodás-

nak indulnak. Az imaginális epidermisz, amely már az egész testfelszint beborítja, kiválasztja a speciális struktúrákat /szőröket, sex-combot, stb./ hordozó adult kutikulát.

1.1.3. A belső szervek metamorfózisa

Az imaginális epidermisz kialakulásával egyidőben megindul a belső szervek metamorfózisa is. Megkezdődik a lárvális szervek hisztolizise és az adult szervkezdemények is differenciálódni kezdenek.

. A lárvális szervek közül először a bélcsatorna elülső szakaszához, a proventriculushoz csatlakozó divertikulumok hisztolizálnak, majd a középbél epitheliális sejtjei is lelöködnek és egy sárga tömeget /un. "yellow body"/ képeznek a bél lumenében /Bodenstein, 1950/. A degenerálódás során az epitelsejtek összezsugorodnak és megtelnek másodlagos lizoszómákkal, amelyekben erős savanyu-foszfataz, proteáz, stb. aktivitás mutatható ki /Radford és Misch, 1971/.

A nyálmirigysejtek szétesését Chironomus lárvákon vizsgálták részletesen /Henrikson és Clever, 1972/. Az utolsó stádiumos lárva nyálmirigyében lévő proteáz a sejtek szekrétumával együtt kiválasztódik a lumenbe, tehát extracelluláris enzim /pH opt. 5,5/. A bábvedlés után, a nyálmirigysejtek degenerálódása idején azonban egy új proteáz enzim jelenik meg /pH opt. 3,5/, amely szigorúan intracelluláris, lizoszómákban lokalizálható, és a sejt degenerációja ezek szétesése nyomán

indul meg /Henrikson és Clever, 1972/.

A metamorfózis során a zsirtest nagyobb része lekerekedett egyes sejtekre esik szét. A bábban a hisztolizis során a sejtméret fokozatosan csökken és ezzel együtt a sejtekben tárolt anyagok /glycogen, lipid, fehérjék/ mennyisége is fogy. A glycogen eltűnése igen gyors és teljes, a lipidé és a proteiné lassabb. A lárvális zsirtest széthullott sejtjei a kifejlett állatból csak a kikelés után tűnnek el véglegesen /Butterworth és LaTendresse, 1973/. Lárvális izmok, oenociták is hisztolizálnak.

A lárvális szervek hisztolizisából származó anyagokból /peptidek, aminosavak, stb./ indul meg az új struktúra, az adult szervek felépítése, ami a hisztolizis után, illetve részben azzal egyidőben kezdődik meg.

A kifejlett állat bélcsatornája a lárvában is megtalálható szervkezdeményekből alakul ki. Az előbél a labiális imágókorongokból és az előgyomor imaginális gyűrűjéből, a középbél az epithelialis hisztoblasztokból, az utóbél pedig a Malpighi-tubulusok beszájadásánál, illetve a végbélnyílásnál lévő imaginális gyűrűből alakul ki.

Az imágó nyálmirigyt a lárvális nyálmirigy kivezetőcsövénél lévő imaginális gyűrűk hozzák létre.

Az izomzat és a zsirtest valószínűleg ujonnan differenciálódó őssejtekből fejlődik ki.

A Malpighi-tubulusok és a hátiedény a bábállapot során nem hisztolizál, hanem folyamatosan működik, és változás nélkül válik az adult szervezet részévé. Az idegrendszerben is csak kisebb átrendeződés történik /Bodenstein, 1950/.

1.2. A hormonok szerepe a rovarok egyedfejlődésében

A rovarok lárvális élete során az egyes növekedési szakaszokat elválasztó vedléseket, valamint a bábállapot során végbemenő metamorfotikus változásokat hormonok szabályozzák. Az egyedfejlődésben két, egymással többé-kevésbé antagonisztikusan működő hormonnak van döntő szerepe. Az egyik a juvenil hormon /JH/, amely fenntartja a rovar lárvális állapotát /"status quo hatás"/, a másik pedig a vedlési hormon /ekdizon/, amelynek a metamorfozisos változások megindításában van kulcsszerepe. E két hormon szintézisének szabályozását az agy pars intercerebralisának neuroszekrécións sejtjeiben termelődő, peptid természetű agyhormon végzi /Riddiford és Truman, 1978; Zdarek és Fraenkel, 1971/.

A vedlési hormont termelő szerv Dipteráknál az agyféltekék között lévő gyűrűmirigy, amelynek laterális sejtjei un. α -ekdizont termelnek. Ezt a célszervek, főként a zsirtest alakítja át β -ekdizonná /20-hidroxiekdizon/, amely az in vitro kísérletekben

kb. százszor aktivabbnak bizonyult az α módosulatnál /Milner és Sang, 1973; Richards, 1978/. Általánosan elfogadott az a vélemény, hogy az α -ekdizon elő-hormon, a β -ekdizon pedig a valódi vedlési hormon.

A β -ekdizon szinte minden szövetre hat, a hormonválasz azonban szövetenként különböző /lárvális szervek hisztolizálnak, adult szervkezdemények differenciálódnak/.

Ahhoz, hogy a β -ekdizonnak a metamorfózis szabályozásában betöltött szerepét tisztázzuk, fontos e hormon in vivo koncentrációváltozásainak ismerete. Ennek mérése a fizikai-kémiai módszerek fejlődésével, elsősorban a rádió-immun-módszer kidolgozásával vált lehetővé, és ma már több rovarfaj ekdizon titergörbéjét ismerjük. Ezeknek a görbéknek a lefutása a különböző fajok esetében igen hasonló.

Drosophilán mért adatok szerint a vedléseket mindig az ekdizonkoncentráció gyors növekedése előzi meg /Maróy és mtsai, 1980; Hodgetts és mtsai, 1977/. Riddiford és munkatársai /1976/ a β -ekdizonnak a Manduca lárvális epidermiszre gyakorolt in vitro hatását vizsgálták. Kísérleteik azt bizonyítják, hogy a bábvedlésekhez mindig két egymást követő ekdizon-csucs szükséges. Az első kisebb csucs kompetenssé teszi a lárvális epidermisz sejteket a báb-kutikula kiválasztására, a második jóval magasabb ekdizon koncentráció pedig indukálja a vedlést és a bábkutikula szintézisét.

Ezeket a megfigyeléseket alátámasztják azok az in vivo ekdizon-titer mérések, amelyeket Bollenbacher és munkatársai /1975/ Manduca sexta lárvákon végeztek. Ezek azt mutatják, hogy a lárva-lárva vedléseket csak egy ekdizon-csucs előzi meg, a lárva-báb vedlést pedig kettő.

E megfigyelés igaz lehet a Dipterák esetében is, mivel a legutóbbi időben Berreur és munkatársai a korai harmadik stádiumos Drosophila lárvák hemolimfájában a pupáriumképzést megindító nagy ekdizon-csucsot megelőzőleg egy kisebb csucsot mutattak ki /Berreur és mtsai, 1979/. E mérések további megerősítésre várnak.

Az eddigi, főleg Lepidopterákon végzett tanulmányok alapján az ekdizon és a JH kölcsönhatása a következő. A lárvaélet alatt a JH és a vedlési hormon is jelen van a hemolimfában, de szintjük nem állandó. A β -ekdizon titeremelkedése mindig vedlést indukál. A JH jelenléte és mennyisége dönti el azt, hogy az epidermiszsejtek milyen kutikulát választanak ki. Ha a JH szintje magas, akkor lárvális, ha alacsony, akkor bábkutikula képződik. Ha JH egyáltalán nincs a hemolimfában, akkor adult jellegű kutikulát választanak ki az epidermisz sejtek /Berill és Karp, 1976/. Ha az átalakuló bábban a JH szintjét mesterségesen megnöveljük, akkor az nem tud adult kutikulát kiválasztani és a metamorfózis többi lépése is gátlott. Ezen alapuló biológiai mérési módszert dolgozott ki Fain és Riddiford /1975/ Manduca sextán.

A Drosophila JH-ről sokkal kevesebb ismeret áll rendelkezésünkre. JH-analógokkal csak késleltetni lehet a

lárva metamorfózisát, de megakadályozni nem, és a JH szint mesterséges megnövelésével számfelletti lárvális vedlés sem indukálható /Posthletwait, 1974/.

Számos kísérletet végeztek az ekdizon hatásmechanizmusának felderítésére. Clever és Karlson mutatták ki először, hogy a Chironomus nyálmirigyének óriáskromoszómáin jelentősen változik a puffmintázat a lárvális vedlések alkalmával, illetve a metamorfózis kezdeti szakaszában, s ezeket a β -ekdizon koncentrációjának változása okozza /Clever és Karlson, 1960/.

Mint az több kutatócsoport által is bizonyított, a puffok az aktiv génműködés helyei, amelyekben intenzív RNS szintézis folyik /Gersh, 1975; Belyaeva és Zhimulev, 1976/. A képződött RNS valószínűleg mRNS-ként a citoplazmába jut és új specifikus fehérjék szintézisét indítja meg. A kései harmadik stádiumos Drosophila lárvák epidermiszsejtjeiben β -ekdizon indukcióra termelődő Dopa-dekarboxilázt mutatott ki Kraminsky /1980/.

A Drosophila melanogaster óriáskromoszómáin a puffmintázat időbeli változását Ashburner és Richards /1976/ vizsgálták részletesen, in vivo és in vitro körülmények között. A pupáriumképzés előtt néhány órával, az ekdizon-koncentráció emelkedésével egy időben aktiválódnak az un. korai puffok, összesen 6. Ezek in vitro 15-20 perces hormonstimulus után már megjelennek, és aktivitásuk /a puffátmérő nagysága/ a hormonkoncentrációval arányos /Ashburner, 1972/. Groenmayer és Pongs /1980/ kimutatták, hogy az ekdizon specifikus receptorhoz kötve a nyálmirigy-

-sejtmagvakba vándorol és az óriáskromoszómákon a korai ekdizon specifikus puffokban halmozódik fel.

Mivel e korai puffrégiók β -ekdizon hatására igen gyorsan és fehérje szintézisgátlók jelenlétében is aktiválódnak, e tények alapján feltételezhető, hogy a korai ekdizon specifikus puffok a β -ekdizon elsődleges hatás-helyeit képviselik.

A β -ekdizon szintje a pupáriumképzést követően erősen lecsökken, majd Drosophila esetében kb. 10 óra múlva újra emelkedni kezd /Klose, 1980/. Ez a csucs időben egybeesik a korai puffok második aktiválódásával /Ashburner, 1972/. A korai puffok után több száz, un. kései puff válik aktívá. In vitro kísérletek azt mutatták, hogy az ekdizon folyamatos jelenléte gátolja a kései puffok kialakulását, azonban az in vivo hormontiter változását utánózva mindegyik puff megjelenik. A fehérjeszintézis gátlása esetében azonban még ilyen körülmények között sem aktiválhatók /Richards, 1976; Ashburner, Richards, 1976/.

1.3. A rovar szövettanyésztés fejlődése és jelentősége

A rovar szövettanyésztésnek az utóbbi években történt rohamos fejlődése jelentősen hozzájárult ahhoz, hogy a rovarok egyedfejlődésének élettani és biokémiai folyamatait alaposabban megismerjük. E fejlődés alapfeltétele olyan táptalajok kidolgozása volt, amelyben a

rovarszövetek hosszabb ideig fenntarthatók. Először Wyatt fejlesztett ki egy olyan tápfolyadékot, amely a Bombyx mori hemolimfájának részletes kémiai analizisén alapult, és annak kémiai összetételét, valamint fizikai állandóit utánozta /Wyatt, 1956/. Azonban olyan szintetikus tápoldatot még nem sikerült előállítani, amelyben valamely rovarszövetet hosszabb ideig fenntarthatnánk és vizsgálhatnánk. Ezért a ma használatos táptalajokat főtális borjusavóval, homo-, vagy heterospecifikus hemolimfával, illetve élesztőkivonattal egészítik ki. A szövettenyésztés fejlődését gyorsító másik tényező a rovarok steril, csiramentes környezetben való tenyésztésének kidolgozása volt /Schneider, 1967; Meynadier, 1971/.

Jelentős lépés volt a korlátlanul fenntartható és szaporodó sejtvonalak izolálása. Az elsőt Grace izolálta Anthaerea eucalypti lepke ováriumából /Grace, 1962/. Ilyen sejtvonalakban jól tanulmányozhatók a rovarokban élő, vagy általuk terjesztett vírusok és egyéb endocelluláris paraziták.

A szövetdifferenciálódás és a hormon-hatásmechanizmus tanulmányozására igen alkalmas objektumok a teljes átalakulással fejlődő rovarok imágókorongjai, így a legtöbb ismerettel ezekről rendelkezünk /lásd: Fristrom és munkatársai, 1976; Mandaron és munkatársai, 1977 összefoglaló munkáit/. Már az első in vitro kísérletek azt mutatták, hogy az imágókorongok differenciációja



/everzió és kutikula-képzés/ a gyűrűmirigy jelenlétével /Kuroda, Yamaguchi, 1956/ vagy vedlési hormonnal indukálhatók /Sengel, Mandaron, 1969/. Mandaron az éppen pupáriumot képező /"white-pupa"/ Drosophila láb és szárny imágókorongjait hormon jelenlétében kulturázva teljes differenciációt figyelt meg. Három nap alatt bábkutikula, majd adult strukturák, érzékszőrök, sőt karom alakultak ki /Mandaron, 1970/. Ursprung és munkatársai az evaginált lábakban izomkontrakciót is megfigyeltek /Ursprung, 1972/, ami az imaginális izomzat de novo differenciálódására utal.

Mások az imágókorongok differenciálódása során végbemenő változásokat tanulmányozták részletesen. Így főként az everzió mechanizmusát /Poodry és Schneiderman, 1970; Fristrom és Fristrom, 1975; Fekete és mtsai, 1975/, valamint az RNS és fehérjeszintézisben hormonhatásra bekövetkező változásokat /Ursprung és mtsai, 1970; Fristrom és mtsai, 1974/.

Jóval kevesebb ismeret áll rendelkezésünkre egyéb szervek in vitro hormonstimulusra adott válaszáról, és ezek is főként Lepidopterákra, illetve más, nem a Kétszárnyuakhoz tartozó rovarokra vonatkoznak. A lárvális zsirtest autolizisét több fajon is vizsgálták. Sass és Kovács /1975/ Mamestra brassicae-n, Oberlander /1976/ a Plodia interpunctella-n, Butterworth és munkatársai pedig a Drosophila zsirtestjében a protein-tartalmu granulák felhalmozódását tanulmányozták /Butterworth és mtsai, 1979/.

Számos in vitro kísérletben vizsgálták a rovarok spermatogenezisét befolyásoló tényezőket is, így például Calliphorán Leloup /1976/, Hyalophora cercopiana pedig Kiss és Williams /1976/.

Shields és munkatársai Drosophila embriókból nyert sejtek fejlődését követték nyomon egy in vitro rendszerben. E sejtek folytatták a sejtdifferenciálódást a táptalajban és különféle lárvális, illetve adult szövettípusra jellemző sejtek fejlődtek belőlük /Shields és mtsai, 1975; Dübendorfer és Eichenberger-Glinz, 1980/. Utóbbi szerzők az in vitro differenciálódott sejtek metamorfózisos változásait is tudták indukálni a β -ekdizon koncentrációjának változtatásával.

Az in vitro rendszerek alkalmasak a vedlési hormon indukálta metamorfózis lépéseinek tanulmányozására. A szövettenyészetekben ellenőrzött körülmények között külön-külön vizsgálhatók az egyes szervek és szövetek, ezeknek a vedlési hormon hatására adott válasza és a különböző szervek közötti kölcsönhatásokat is nyomon követhetjük. Mivel az in vitro kultúrákban használt Shields-féle táptalaj megközelíti a vad típusu Drosophila hemolimfájának összetételét, így lehetővé teszi a szövetek hosszú túlélését és a hormon-hatásmechanizmus tanulmányozását.

2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

2.1. A felhasznált állatok

Kisérlleteinkben a Drosophila melanogaster vad típusu OREGON-R, illetve a laboratóriumban korábban izolált X kromoszómás mutáns törzseket használtuk. E mutánsok lárvális fejlődése normális /4 nap 25°C-on/ de egyáltalán nem / $\ell(1)npr-1$ és -3 /, vagy csak későn és torz bábokat képeznek / $\ell(1)lpr-1$ és -2 /; Kiss és mtsai, 1976, 1978/. A mutáns kromoszóma hordozta a letalitást, valamint a y, w és sn³ marker mutációkat. A törzseket Binsn balanszer kromoszóma segítségével tartottuk fenn. A y w sn³ ℓ/Y mutáns him lárvák felismerhetők a y, világos szájszerv és a w, szintelen Malpighi-tubulusok alapján. /A sn³ markermutáció lárvában nem fejlődik ki, ezért számunkra nem volt lényeges./

A vad típusu egész állat kulturákhöz olyan késői harmadik stádiumu lárvákat boncoltunk, amelyek a táptalajból már a falra vándoroltak, bábozódásra alkalmas helyet keresve. Azonban csak azokat használtuk fel, amelyek nyálmirigyében a szekrétumnak a lumenbe történő kiválasztása még nem kezdődött meg. Mivel ez az ekdizon koncentráció-növekedés megkezdése után 3-4 órával történik /Boyd és Ashburner, 1977/, e kritérium alapján jól szinkronizálhattuk azokat az állatokat, amelyekben az ekdizon

szintézis még nem kezdődött meg, de legalábbis nem volt jelentős.

A testfalkulturákhoz fiatal harmadik stádiumu /kelestől számított 55 h/ és középharmadik stádiumu /72 h/ lárvákat is használtunk.

A mutáns törzsek esetében 4 napos "érett" és idős, hosszan túlélő lárvákat is boncoltunk.

2.2. Steril tenyészetek indítása és fenntartása

A szervkulturák készítéséhez igen sok, steril körülmények között felnevelt lárvára volt szükségünk. Ezeket kezdetben minden alkalommal a peték felületi sterilizálásával hoztuk létre. Azonban ez munkaigényessége és a lárvák aszinkron fejlődése miatt nem volt kielégítő. Ezért egy új módszert dolgoztunk ki a hosszú ideig fenntartható csiramentes törzsek egyszerű kezelésére /Molnár és Kiss, 1980/. Ezt az alábbiakban röviden összefoglalom.

2.2.1. Táptalaj a steril tenyészetek számára

Az állatokat nagy méretű kémcsőben /20 mm x 200 mm/, 25°C-on, ferde formában kiöntött kukoricaliszt-élesztő-agar táptalajon neveltük, amelyet előzőleg 30 percig 121°C-on autoklávban sterilizáltunk. Az autoklávozás egyrészt karamellizálja a szokásos Drosophila táptalajban lévő cukrot, másrészt elroncsolja az élesztő vitamin-

tartalmának nagy részét is, így az autoklávozott standard táptalajon a lárvák igen lassan, aszinkron módon fejlődnek.

Ezért módosítottuk a táptalaj összetételét. Egyrészt kihagytuk belőle a cukrot, másrészt növeltük az élesztő és a kukoricaliszt mennyiségét. Ezáltal sikerült visszaállítani a lárvák normális fejlődési ütemét /4 nap 25°C-on/.

A módosított táptalaj összetétele :

kukoricaliszt	:	126 g
pékélesztő	:	220 g
CaCl ₂	:	0,5 g
agar	:	8,9 g
viz	:	ad 1000 ml

2.2.2. A peték sterilizálása és a legyek átvitele új táptalajra

Az alábbiakban leírt munkafolyamatokat lamináris áramlású sterilfülkében végeztük.

A néhány órán át gyűjtött petéket először finom nylon szitán át csapvizzel alaposan mostuk, majd 8 percre szobahőmérsékleten telített CaOCl oldatba merítettük. Ezután steril desztillált vízzel többször mostuk, majd Pasteur-pipettával steril táptalajra vittük.

A kikelt legyeket enyhe ütögetéssel eltávolítottuk a kémcső szájától, majd azt erősen leégettük. A felforrósodott kémcsőnyílást a legyek nem tudják megközele-

teni, így a kémcső percekig nyitva tartható. A legyeket széles száju /3-4 mm átmérőjű/, a végén vattadugóval elzárt, vákumszivattyúhoz csatlakoztatott Pasteur-pipettával gyűjtöttük össze, majd a szivás megszüntetése után a pipettából egy uj táptalajra ráztuk.

Szinkronizált peték gyűjtése: A legyeket a fent leirt módon egy üres kémcsőbe ráztuk, majd ezt egy olyan vattadugóval zártuk le, amelyből hurkapálcához kötözve egy táptalajjal lecseppentett szűrőpapir nyult le a kémcső aljáig. Mivel a kémcső egyébként üres, a legyek csak a táptalajos szűrőpapircsikra petéznek. Egy-két órás petegyűjtés után a dugó a legyek minimális zavarásával újra cserélhető. A petéket hordozó szűrőpapircsikot pedig egy táptalajt tartalmazó kémcsőbe helyeztük.

A tenyészetek sterilitásának ellenőrzésére néhány legyet élesztő tápfolyadékba tettünk /DIFCO élesztő-kivonat, 0,5 g; glükóz, 1 g; csapviz ad 100 ml/. Élesztő fertőzés esetén két nappal az "inokulálás" után a folyadék megzavarosodott. Az esetenként előforduló penészgombás és bakteriális fertőzések szabad szemmel is könnyen észrevehetőek voltak.

2.3. Szervkulturák készítése

A szervkulturákhoz a steril körülmények között nevelt és előzőleg steril desztillált vízzel leöblített lárvákat 5 ml minimal Robb tápoldatban /Fristrom és mtsai,

1973/ finomhegyü, rozsdamentes csipesszel boncoltuk, Zeiss /Jena/ preparáló mikroszkóp alatt. Az "egész állat" kulturákhoz a kiválasztott lárva testfalát középtájon felszakítottuk és enyhe huzással két részre téptük úgy, hogy a bélcsatorna ne sérüljön meg. Ezután mindkét felet kesztyűujjszerűen kifordítottuk, majd a tracheák elszakításával az egyes szerveket kissé különválasztottuk, az egészet fellazítottuk. Ezáltal minimális károsodás árán feltárult az egész belső testfelszín és a belső szervek. Azokból az állatokból, amelyekből ekdizion-mentes táptalajban akartunk kulturát készíteni, eltávolítottuk a gyűrűmirigyet.

A testfalkulturák készítéséhez üvegbotra erősített pengével először levágtuk a lárva első 2-3 szegmentjét, majd a testet hosszában is kettévágtuk. Ezzel a módszerrel kevésbé roncsoltuk a testfalat, mintha csipesszel szakítottuk volna. A belső szerveket és az izom egy részét is eltávolítottuk a testfaldarabokról. A testfal egyik felét kontrollként, a másikat a kísérlethez használtuk.

A kutikula-kulturák készítéséhez a testfaldarabokat 70% alkoholba mártottuk, ahol az epidermiszsejtek elhalnak, leválnak, és ecsettel könnyen eltávolíthatók a kutikuláról /Hackman, 1977/.

A boncolás után a lárvákat, valamint a testfal- és kutikuladarabokat egyenként Mikrotiter lemez /Sterilin TC Grade/ mélyedéseibe tettük át, amelyek 50 µl táptalajt tartalmaztak. A táptalajt az inkubációs idő

alatt nem cseréltük. A lemezt nedveskamrában tartottuk 25°C-on, az egész állat kulturák esetében levegőn, a testfal- és kutikula-kulturák esetében 70% O₂-t tartalmazó atmoszférában.

2.4. A szervek fenntartására használt tápoldatok

Kulturáinkban a Shields és Sang /1975/ által Drosophila embrionális szövetekre kidolgozott tápoldatot használtuk, amelyet a felhasználás előtt 10% fötális borjuszavóval egészítettünk ki /Bio-Cult., Glasgow, Scotland/. A tápoldatba antibiotikumot nem tettünk.

A kontroll kísérlet a hormont nem tartalmazó Shields tápoldatban inkubált testfal vagy egész állat kultúra volt.

A hormonválasz kiváltására 1 µg/ml β-ekdizont /Rhoto-Pharm. Co/ tartalmazó tápoldatot használtunk, amit a kulturázás időtartama alatt nem cseréltünk. Bár a szövetek valószínűleg inaktiválták a β-ekdizon egy részét, az aktív hormonkoncentráció még négy hét után is meghaladta a láb imágókorongok everziójához szükséges küszöbkoncentráció-értéket, ugyanis a frissen boncolt láb-imágókorongok ilyen táptalajban is evertáltak.

A csupasz kutikulát Shields tápoldatban oldott 100-500 µg/ml N-acetil-dopamin /Sigma/ jelenlétében inkubáltuk. Kontrollként ugyanazon lárva kutikulájának egy másik darabja szolgált, amit N-acetil-dopamin nélküli tápoldatban tartottunk.

2.5. A kulturák értékelése

A kulturák állapotát Zeiss /Jena/ preparáló mikroszkóppal 25-szörös nagyítással ellenőriztük. A sejt-halál kimutatására minimal Robb táptalajban oldott 0,4% tripánkék festéket használtunk. Ezt a festéket általánosan használják szövettenyészetekben az elhalt sejtek kimutatására, ugyanis azok membránja átengedi, míg az élő sejtek membránja kizárja a citoplazmából. Egyes szövetdarabok gyakran részlegesen festődtek; ilyenkor becsléssel állapítottuk meg, hogy a kulturázott szerv vagy szövetdarab sejtjeinek hány százaléka festődött.

A testfalkulturák esetében a kutikula barnulásának /tanning/ mértékét az alábbi, önkényesen felállított Kvalitatív skála alapján értékeltük :

- 0 : nem szklerotizált;
- 1 : nagyon gyengén szklerotizált;
- 2 : határozottan szklerotizált;
- 3 : azonos mértékű az in vivo szklerotizációval.

3. EREDMÉNYEK

3.1. A vad típusu szövetkulturák β -ekdizon nélküli táptalajban

A szervek hosszabb-rövidebb ideig túléltek az in vitro kulturákban, bár az idő előrehaladásával a tripánkéssel festhető sejtek száma emelkedett, ami az elhalt sejtek számának növekedésére utal. Nagy különbségeket találtunk az egyes szervek között az in vitro fenntarthatóság tekintetében. Néhány szerv igen gyorsan elhalt. A középbél /a proventriculussal és a divertriculumokkal együtt/ bizonyult a legérzékenyebbnek, mivel a középbél mozgása már néhány órával a boncolás után megszűnt, az epithelialis sejtek pedig tripánkéssel erősen festődtek.

A nyálmirigy esetében nem kaptunk egyértelmű adatokat, mert egyes részei főként a disztális vége, már néhány nap után festődtek, más részei pedig még több hetes inkubálás után sem vették fel a festéket.

A lárvális epidermisz, az izmok és a gonádok 2-3 nap után kezdtek elhalni az általunk használt médiumban.

Az agy, a Malpighi-tubulusok, a nyelvcső és utóbél, a zsirtest, valamint az imaginális szervkezdemények igen hosszú ideig fenntarthatók in vitro körülmények között. Az általunk leghosszabb ideig, 5 hétig

inkubált kulturákban is tripánkéssel alig, vagy egyáltalán nem festődtek, az utóbél perisztaltikus mozgása pedig számos kulturában még akkor is igen aktív volt.

A szöveteket mindaddig túlélőnek tekintettük, míg a sejteknek legalább 1/3-a nem vette fel a fetéket. A szervek túlélésére vonatkozó adatokat az 1. táblázat foglalja össze.

Metamorfotikus változások egyáltalán nem vagy csak ritkán, és akkor is igen korlátozott mértékben fordultak elő, főként a hosszú ideig inkubált kulturákban.

3.2. Vad típusú szövetkulturák 1 µg/ml β-ekdizon jelenlétében

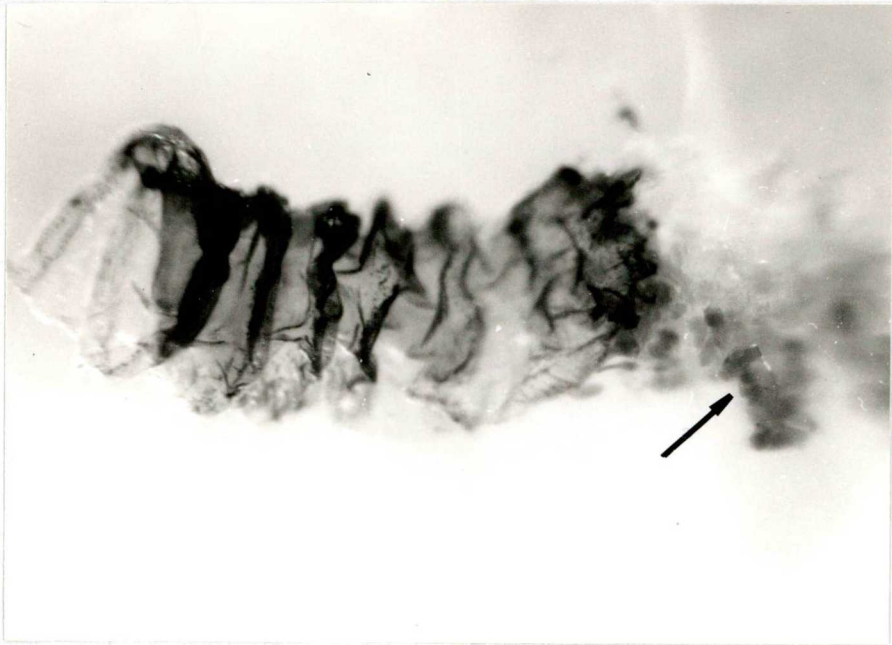
Mivel a középbél, a lárvális izmok, a gonádok és a nyálmirigy *in vitro* körülmények között nagyon hamar elpusztultak, így ezek hormonválasza nem vizsgálható az általunk kidolgozott rendszerben. Ezért a továbbiakban csak azokkal a szervekkel foglalkozunk, amelyek a hormonstimulusra jellegzetes szövetspecifikus választ adtak.

a/ A lárvális epidermisz az izmokkal együtt levált a kutikuláról, amelyről csipesszel könnyen és egészben eltávolíthatjuk /1. ábra/. Ez a leválás valószínűleg megfelel az *in vivo* körülmények között, a "prepupalis vedlés" előtt lejátszódó apolizisnek. Prepupalis kutikulát azonban egyik kulturában sem találtunk.

1. Táblázat

Lárvális szövetek életképessége in vitro β -ekdizon
nélküli táptalajban

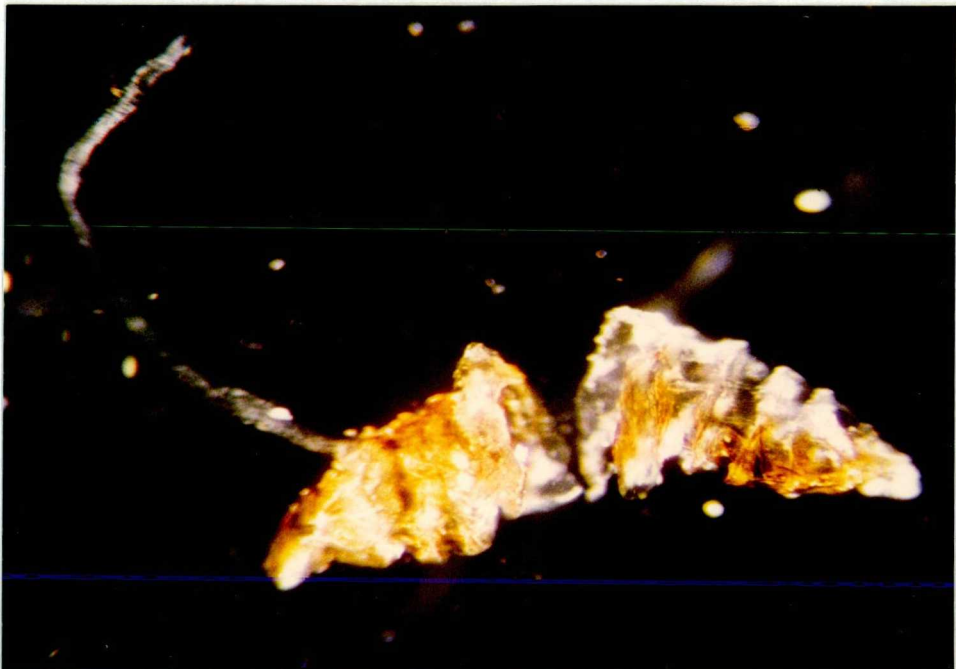
Szövet/szerv	Tulélési idő
épidermisz	3 nap
izmok	3 nap
zsirtest	\geq 5 hét
nyálmirigy	\geq 5 hét
középbél	1-2 óra
utóbél	\geq 5 hét
imágókorongok	\geq 5 hét
imaginális "gyűrük"	\geq 5 hét
Malpighi-edény	4-5 hét
gonádok	2-3 nap



1. ábra

Vad típusu lárva testfalának darabja egy hetes in vitro inkubálás után, $1 \mu\text{g/ml}$ β -ekdizon jelenlétében

Az epidermisz és a lárvális izmok az apolízis következtében könnyedén leválaszthatók a szklerotizált kutikuláról /nyíl/ /45x/.



2. ábra

Vad típusu lárva kutikulája 1 hetes in vitro inkubálás után, $1 \mu\text{g/ml}$ β -ekdizon jelenlétében.

A kutikula egyes részei erősen megbarnultak és szklerotizálódtak.

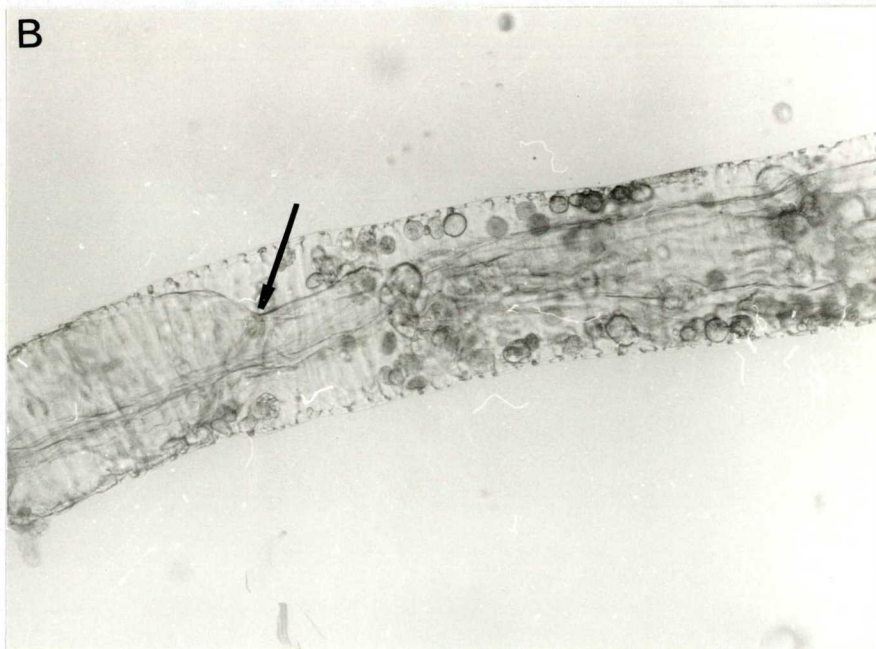
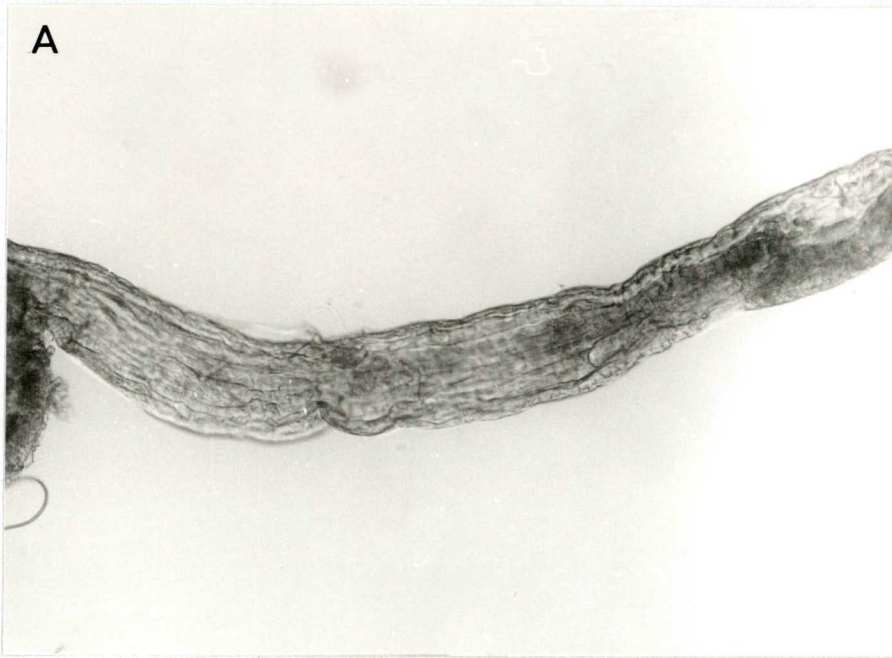


b/ A lárvális kutikula megkeményedett /szklerotizált/ és megbarnult /tanning/ /2. ábra/. A barnulás azonban halványabb volt, mint in vivo, és csak kisebb-nagyobb foltokra korlátozódott. A barnulás sebessége is lassabb volt az in vivo reakcióénál: ehhez az in vitro körülmények között 6-7 napra volt szükség, míg in vivo ez néhány óra alatt lejátszódik.

c/ Az utóbél esetében kétféle hormonhatást figyeltünk meg: a perisztaltikus mozgás 1-2 napon belül megszűnt, ami valószínűleg az izmok degenerálódásával magyarázható;

a belső kutikula-bélés lelökődött a lumenbe /3. ábra/. Mivel ez a kutikula jóval vastagabb volt, mint a béltartalmat burkoló peritrofikus membrán, azzal nem lehetett összetéveszteni. Így ez a kutikula-leválás is feltehetően az in vivo vedlésekkor is lejátszódó apolizissel azonosítható.

d/ A zsirtestlebenyek nagy része 2-3 nappal a kultura indítása után a bazális membrán feloldódásával egyes lekerekedett sejtekre esett szét /4. ábra/. Azonban a legtöbb esetben maradtak néhány sejtből álló disszociálatlan részek, főleg az utóbélhez tapadó hátsó zsirtestpárnában. A 2. táblázatban nem tettünk különbséget a teljes és részleges szétesés között. Az egyes sejtek nagy része, főleg a hosszú idejű kulturázás után tripánkével festődött.



3. ábra

- A: Vad típusu utóbél három hetes kulturából, β -ekdizon nélkül inkubálva. A belső kutikula nem apolizált /70x/.
- B: Ugyanaz mint az A, de 1 $\mu\text{g/ml}$ β -ekdizon jelenlétében inkubálva. A belső kutikula lelöködött a bél üregébe /nyíl/ /150x/.



4. ábra

- A: Vad típusu zsirtest két hetes kulturából β -ekdizon nélkül. A szövet megtartotta lárvális jellegét /30x/.
- B: Ugyanaz mint az A, de 1 $\mu\text{g/ml}$ β -ekdizon jelenlétében inkubálva. A zsirtest teljes mértékben szétesett egyes sejtekre /a két átlátszatlan tömeg a lárvális test két fele/ /24x/.

2. Táblázat β -ekdizon hatása vad típusu lárvális szövetekre in vitro

Lárvák kora a kulturázás kezdetén /napokban/	In vitro inkubálás időtartama /napokban/	Metamorfózisos változásokat mutató kulturák gyakorisága %/ ¹															
		Testfal				Imágókorongok						Utóbél				Zsirtest	
		Kutikula szklero- tizáció		Epidermisz apolizise		Everzió		Kutikula képződés		Szem- pigment lerakódás		Mozgás		Belső kuti- kula apolizise		Fragmen- táció	
		- β E	+ β E	- β E	+ β E	- β E	+ β E	- β E	+ β E	- β E	+ β E	- β E	+ β E	- β E	+ β E	- β E	+ β E
4	6	0	60	0	100	0	100	0	43	0	50	81	7	0	100	0	100
	11	8	92	0	100	0	100	0	83	0	58	91	9	0	100	0	83
	21	20	91	17	100	0	100	0	91	0	91	58	0	8	100	0	55

¹ Legalább 24 kulturát értékeltünk ki minden egyes kulturázási időtartamra

- β E : ekdizon nélküli táptalajban

+ β E : 1 μ g/ml β -ekdizont tartalmazó táptalajban

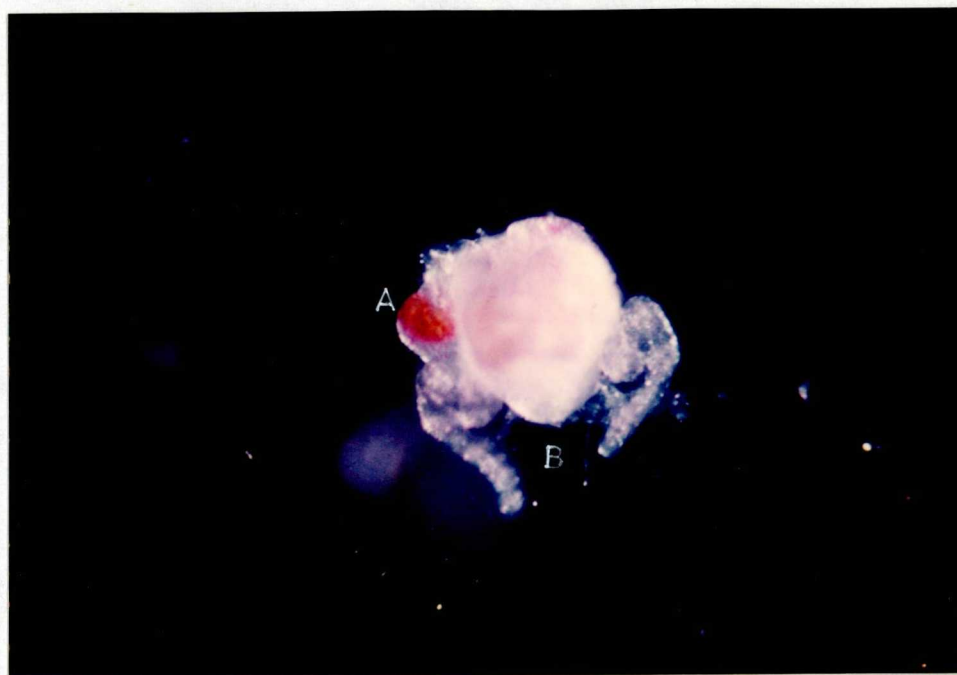


e/ Az imágókorongok minden esetben evertáltak, számos esetben kutikulát is választottak ki, a szemdiszkuszok pedig pigmentálódtak /5. ábra/. Az evagináció 24 h alatt megtörtént, de mértéke gyakran ugyanazon kulturában is különböző volt. A láb-korongok femur és coxa részei számos esetben hólyagszerűen felfuvódtak, és az epidermiszsejtek a kutikulát e gömb belső felületére választották ki /6. ábra/. A kutikulán néhány esetben adult strukturákat is megfigyelhettünk. A bábkutikula kiválasztásához kb. 6 napra volt szükség, adult kutikula pedig csak a 10. nap után jelent meg a kulturák kb. 10%-ában /7. ábra/. A szemkorongok pigmentálódása a 4.-5. napon kezdődött és a kulturázás egész időtartama alatt erősödött.

A többi imaginális szervkezdemény /bélcsatorna és nyálmirigy imaginális gyűrűi/ differenciálódását és fejlődését csak nagyon ritkán figyelhettük meg, és akkor is igen kezdetleges stádiumban megállt.

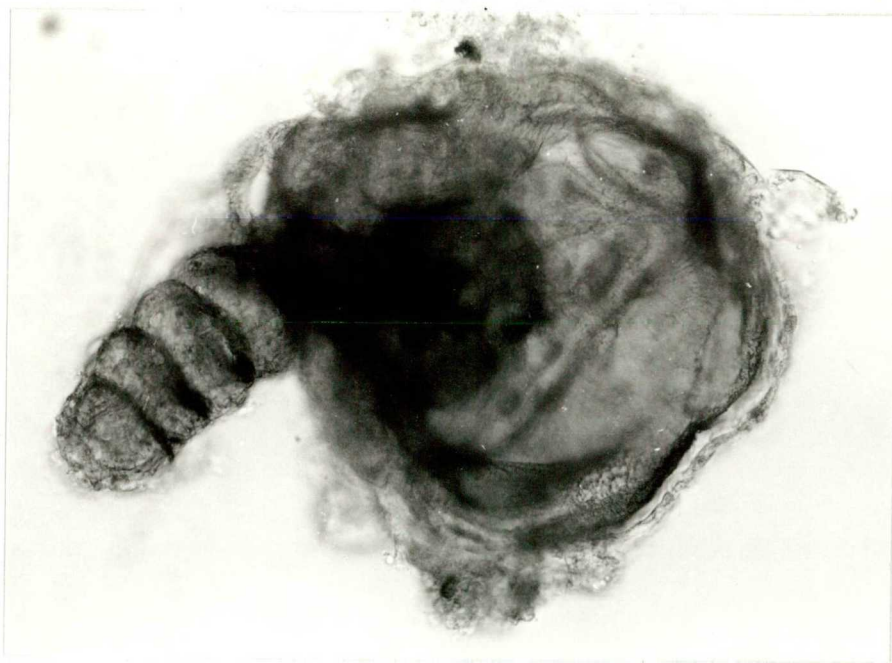
3.3. Mutáns szövetek β -ekdizon nélkül

A mutáns törzsek esetében érett, késői harmadik stádiumos /4 napos/ és hosszan túlélő lárvák szövegeteit egyaránt vizsgáltuk. Az $\ell(1)npr-3$, $\ell(1)lpr-1$ és -2 szervei a hormonmentes kulturákban ugyanugy viselkedtek, mint az Oregon-R lárvák szervei. Az $\ell(1)npr-1$ azonban néhány szempontból eltért a vad típustól. Az idős lárvákból készült kulturákban néhány olyan elváltozást fi-



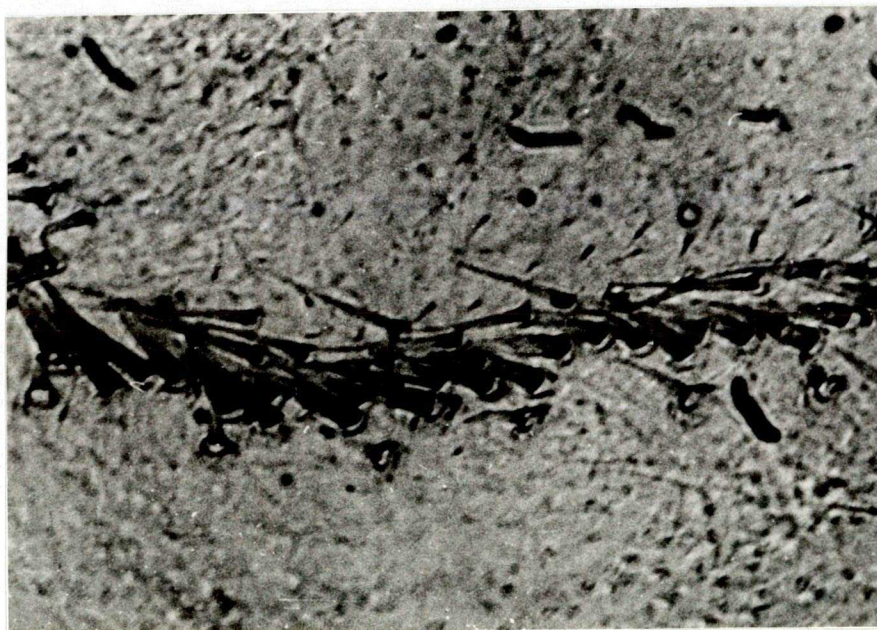
5. ábra

Vad típusu lárvális agykomplex négy hetes kulturából, 1 $\mu\text{g/ml}$ β -ekdizon jelenlétében. A szem-imágókorongok pigmentálódtak /A/, a láb-imágókorongok pedig evertáltak /B/ /45x/.



6. ábra

Vad típusu láb-imágókorong két hetes kulturából, 1 $\mu\text{g/ml}$ β -ekdizon jelenlétében. A korong alapi része gömbszerűen felfuvódott és belül struktura nélküli, báb-jellegű kutikulát választott ki /300x/.



7. ábra

Vad típusu szárny-imágókorong két hetes kultu-
rából, 1 $\mu\text{g/ml}$ β -ekdizon jelenlétében

Az epidermiszsejtek adult kutikulát választottak
ki, amelyen a szárny-élre jellemző sörtesor jól
látható /400x/.

3. Táblázat β -ekdizon hatása az npr mutánsok lárvális szöveteire in vitro

Mutáns	Lárvák kora a kulturázás kezdetén	In vitro inkubálás időtartama /nap/	Metamorfózisos változásokat mutató kulturák gyakorisága %/ ¹													
			Testfal				Imágókorongok ²				Utóbél				Zsirtest	
			Kutikula szklerotizáció		Epidermisz apolizise		Everzió		Kutikula képződés		Mozgás		Belső kutikula apolizise		Fragmentáció	
- β E	+ β E	- β E	+ β E	- β E	+ β E	- β E	+ β E	- β E	+ β E	- β E	+ β E	- β E	+ β E	- β E	+ β E	
<u>$\lambda(1)npr-1$</u> ³	4	7	25	44	0	100	0	38	0	38	70	30	0	100	0	0
		12	40	70	0	100	10	50	0	40	80	60	0	100	0	0
	6	6	22	20	0	100	75	100	0	70	94	47	0	100	0	0
12		44	38	0	100	50	100	0	90	100	78	0	100	0	0	
8	7	80	78	0	100	100	100	0	100	60	17	60	100	0	0	
	14	100	100	0	100	100	100	0	100	0	8	100	100	0	0	
<u>$\lambda(1)npr-3$</u>	6	6	17	42	0	100	N.a.	N.a.	100	18	0	100	0	?		
		12	18	33	0	100	N.a.	N.a.	100	25	0	100	0	?		
	10	6	9	30	0	100	N.a.	N.a.	100	38	0	100	0	?		
		12	17	33	0	100	N.a.	N.a.	100	0	0	100	0	?		
	17	7	0	33	33	100	N.a.	N.a.	83	0	0	100	0	?		
		12	0	66	0	100	N.a.	N.a.	66	0	0	100	0	?		

¹Legalább 24 kulturát értékeltünk ki minden egyes kulturázási időtartamra

²A w marker-mutáció megakadályozta a szem-imágókorongok esetleges pigmentálódását.

³A kutikula barnulása és szklerotizációja igen gyenge maradt

Rövidítések: N.a. = nem alkalmazható; ? = bizonytalan; - β E = β -ekdizon nélküli táptalajban;

+ β E = 1 μ g/ml β -ekdizont tartalmazó táptalajban

gyeltünk meg, amelyek a vad típus kulturáiban csak hormon hatására alakultak ki: megindult a lárvális kutikula barnulása, az imágókorongok evaginálni kezdtek, az utóbél mozgása csökkent, és a belső kutikula is apolizált. E reakciók azonban igen kezdeti stádiumban megakadtak, a kutikula barnulása igen halvány maradt, és az imágókorongok evaginációja is torz volt, a peripodiális membránon belül történt. Ezek a változások in vivo is megfigyelhetők az idős ℓ(1)npr-1 lárvákban. Az in vitro kulturákban e változások gyakorisága annál nagyobb volt, minél idősebb lárvából készült a szövetkultura. Az eredményeket a 3. táblázat tartalmazza.

3.4. Mutáns szövetek β-ekdizon jelenlétében

Az ℓ(1)npr-3 és ℓ(1)lpr-1;2 mutánsok szövetei a hormonális stimulusra is a vad tipushoz hasonlóan válaszoltak. Eltérést csak a zsirtest és az imágókorongok tekintetében találtunk. Az ℓ(1)lpr-1 esetében hosszú inkubálás után is csak néhány egyes zsirtest sejtet találtunk a kulturákban, az ℓ(1)npr-3 kulturákban pedig néhány sejtből álló sejtcsoportokra esett szét a zsirtest. Ez utóbbi törzsnél az értékelést megnehezítette, hogy a lárvális zsirtest kicsi, és kevés sejtből állt /Kiss és mtsai, 1978/.

Az ℓ(1)lpr-1 törzs imágókorongjai β-ekdizon jelenlétében degenerálódtak és szétestek, hormonmentes tápoldatban viszont még hosszú idejű inkubálás után sem festőd-

tek tripánkéekkel. Az $\lambda(1)1pr-2$ diszkuszai azonban opálos fehérré váltak a hormonmentes tápoldatban is és tripánkéekkel erősen festődtek. Ezért diszkuszokra vonatkozó adatokat a 4. táblázat nem tartalmaz.

A vad tipustól a legtöbb eltérést az $\lambda(1)npr-1$ szövetei mutatták. A kutikula barnulása ugyan megkezdődött, de igen halvány maradt, még hosszú idejű inkubálás esetén is, és gyakorisága sem különbözött szignifikánsan a hormon nélküli kulturáétól. A hipodermisz azonban a vad tipushoz hasonlóan csak β -ekdizon jelenlétében vált le a kutikuláról.

Az utóbél mozgása valamelyest csökkent β -ekdizon jelenlétében, de nem szűnt meg, ellentétben a vad tipussal.

A zsirtest sohasem disszociált egyes sejtekre. A β -ekdizon határozottan növelte a diszkuszok everziójának a gyakoriságát. Az imágókorongok megduzzadtak, néhány tarzális szegment láthatóvá vált, de a peripodiális membrán nem szakadt fel /8. ábra/. Hasonlót láthatunk 8-10 napos túlélő lárvákban.

3.5. A lárvális kutikula tanelése és szklerotizációja 70% O_2 atmoszférában

A metamorfózis első lényeges és szembetűnő lépése a pupáriumképzés, a lárvális kutikula tanelése és szklerotizációja. Ezért ezt a folyamatot a többi metamorfotikus változásoknál részletesebben vizsgáltuk az in vitro rendszerünkben.

4. Táblázat β -ekdizon hatása az lpr mutánsok lárvális szöveteire in vitro

Mutáns	Lárvák kora a kulturázás kezdetén /napokban/	In vitro kulturázás időtartama /napokban/	Metamorfózisos változásokat mutató kulturák gyakorisága/% ¹									
			Testfal				Utóbél				Zsirtest	
			Kutikula szklerotizáció		Epidermisz apolizise		Mozgás		Belső kutikula apolizise		Fragmentáció	
- β E	+ β E	- β E	+ β E	- β E	+ β E	- β E	+ β E	- β E	+ β E	- β E	+ β E	
<u>l(1)lpr-1</u>	4	6	17	50	0	100	83	25	0	100	0	100 ²
		10	17	50	0	100	83	0	0	100	0	100 ²
	14	6	8	75	0	100	79	0	0	100	0	70 ²
		10	18	92	36	100	N.a.		33	100	0	100 ²
<u>l(1)lpr-2</u>	6	7	0	25	0	100	75	33	0	100	0	92
		10	0	75	0	100	100	8	17	100	0	100
	10	7	0	58	0	100	92	29	0	100	0	58
		10	0	50	0	100	100	0	0	100	0	100

¹ Legalább 24 kulturát értékeltünk ki minden egyes kulturázási időtartamra

² Kevés sejt szabadult ki a zsirtestből

N.a. = Nincs adat

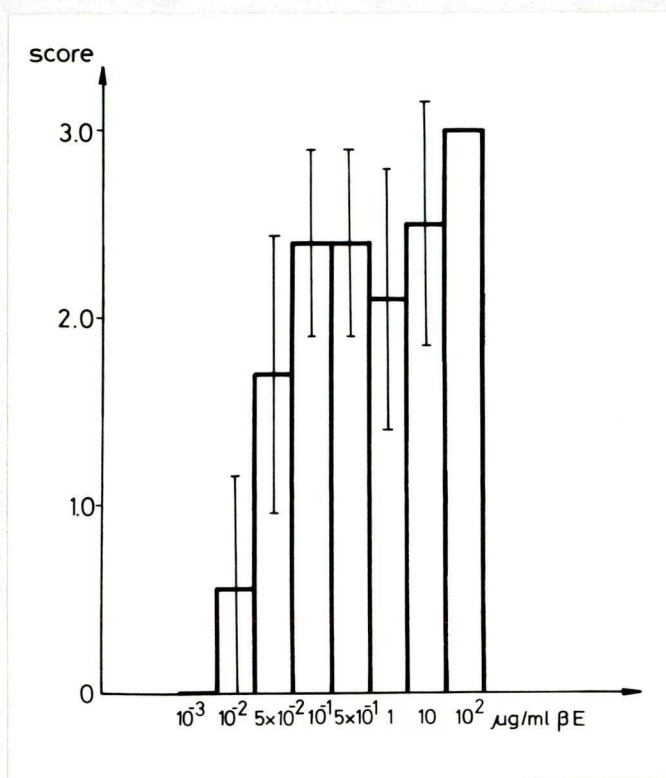




8. ábra

l(1)npr-1 láb- és szárny-imágókorongjai egy hetes kulturából, $1 \mu\text{g/ml}$ β -ekdizon jelenlétében. Az e-verzió torz, a peripodiális membrán nem szakadt fel.

Mint az előzetes kísérletekből kiderült, az epidermisz-sejtek hormonválaszától függő szklerotizációt erősen növeli az, ha a testfalkulturákat $70\% \text{O}_2$ atmoszférában inkubáljuk. Érett, harmadik stádiumu lárvák testfalának esetében meghatároztuk a tanelés és szklerotizáció kiváltásához szükséges minimális β -ekdizon koncentrációt. Mint azt a 9. ábra mutatja, a küszöbkonzentráció $10^{-2} \mu\text{g/ml}$ β -ekdizon, bár ilyen alacsony koncentrációnál még csak a kulturák egy részében tapasztaltunk igen gyenge barnulást. A magasabb koncentrációk erősebb barnulást okoztak. Mint az az ábrán látható, főként az alacsony koncentrációk esetében a szórás értéke is igen nagy. Ez feltehetően nem csak az értékelés hibájából származik, hanem ehhez a lár-

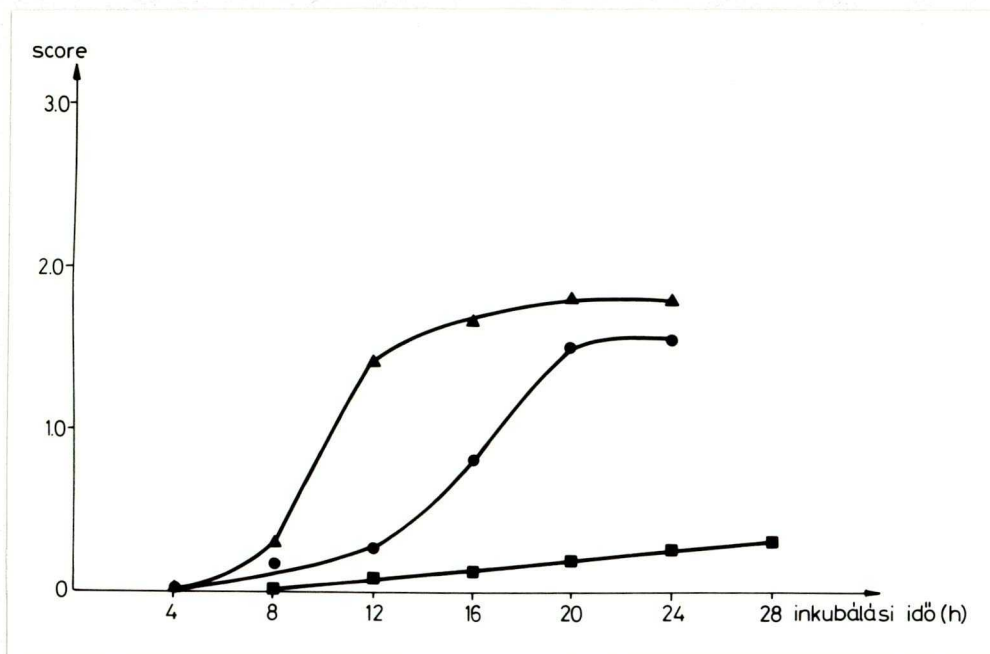


9. ábra

A lárvális testfal barnulását és szklerotizációját kiváltó β -ekdizon minimális mennyiségének meghatározása. A testfalkulturákat két napos inkubálás után értékeltük. A küszöbkonzentráció 10^{-2} $\mu\text{g/ml}$ β -ekdizon. /Mindegyik koncentrációnál legalább 24 kulturát értékeltünk./

vák nem tökéletes szinkronitása is hozzájárul.

A tannelés időbeli folyamatát a 10. ábra szemlélteti. A barnulás megindulásához 7-8 órára van szükség /lag periódus/, amely után a folyamat sebessége és mértéke is a hormonkoncentrációtól függ.



10. ábra

A tanelési folyamat kinetikája. A lárvális testfal szklerotizációjának mértéke és sebessége a hormon-koncentráció növekedésével arányosan nő. A lag periódus 6-8 óra.

□=0,05 µg/ml; ○=0,1 µg/ml; Δ= 10 µg/ml β-ekdizon

Ugyanilyen kísérleti körülmények között hasonló eredményeket kaptunk a 72 h /közép harmadik stádiumu/ lárvák testfalának kulturázásakor is, azzal a különbséggel, hogy a barnulás sebessége valamivel lassabb volt.

A fiatal harmadik stádiumu /55 h/ lárvák testfalkulturáinak csak kb. 15%-ában láttunk gyenge barnulást 10 µg/ml β-ekdizon jelenlétében is. Ebből arra következtethetünk, hogy a lárvális epidermisz körülbelül ebben az időben válik kompetenssé a hormonválaszra.

Annak eldöntésére, hogy a tannelési folyamat lejátszódásakor milyen makromolekulák szintézise szükséges, különböző gátlószerek hatását teszteltük. A gátlószert a hormonnal együtt adtuk, és a két napos inkubálási idő alatt végig jelen volt. A részletes eredményeket az 5. táblázat tartalmazza. Mint ahogyan azt vártuk, az RNS és fehérjeszintézisre, valamint az oxidatív foszforilációra ható gátlószerek a lárvális kutikula tannelését megakadályozták. Az α -metil-DOPA, amely a DOPA-dekarboxiláz specifikus inhibitora, azonban csak igen magas koncentrációban mutatott gyenge gátlást.

A citokalazinB, kolcemid, fenil-tio-urea /PTU/ nem gátolta a tannelési folyamatot.

3.6. Az N-acetil-dopamin hatása a lárvális kutikulára

Az N-acetil-dopamin önmagában is előidézi a vad típusu kutikula barnulását és megkeményedését. Ezekben a kísérletekben az epidermiszt eltávolítottuk, így csak a csupasz kutikulát tettük az N-acetil-dopamint tartalmazó táptalajba és 70% O₂ atmoszférában inkubáltuk. A két napos inkubálás után a kutikula darabok megbarnultak és szklerotizáltak. A reakció erőssége megközelítette az in vivo tannelés mértékét. Az N-acetil-dopamint nem tartalmazó, vagy csak β -ekdizont tartalmazó kulturákban a kutikula várákozásunknak megfelelően - változatlan maradt.

5. Táblázat Gátlószerek hatása a β -ekdizon
indukálta tanelésre

Gátlószer	Koncentráció $\mu\text{g/ml}$	Gátlás %
α -amanitine	0,1	25
	1,0	100
Actinomycin D	0,1	0
	1,0	100
Puromycin	0,1	0
	1,0	25
	10	100
Cycloheximide	0,01	0
	0,1	25
	1,0	100
Oligomycin	1,0	0
	10	100
Cytochalasin B	10	0
Colcemid	10	0
α -metil-DOPA	100	~30
PTU	100	0

Mivel az ℓ(1)npr-1 lárvális kutikulája a korábbi in vitro kísérleteinkben nem mutatott határozott hormonválaszt, ezért megvizsgáltuk, hogy hogyan viselkedik N-acetil-dopamin jelenlétében. A csupasz mutáns kutikula az N-acetil-dopamint tartalmazó táptalajban és 70% O₂ atmoszférában a vad típusuéhoz hasonlóan erősen megbarnult és megkeményedett.

4. AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

4.1. Az in vitro rendszer

Mint az az eredményekből kitűnik, az általunk kidolgozott in vitro rendszer alkalmas a metamorfózis vizsgálatára. Szervkulturáinkban a β -ekdizon hatására számos szövet-specifikus választ figyeltünk meg. In vitro körülmények között főként a metamorfózis korai szakaszában lejátszódó folyamatokat reprodukáltuk. Rendszerünkben nem vizsgálható a nyálmirigy, a középbél és az izmok metamorfózisa, egyéb szervek azonban a vedlési hormon jelenlétében az in vivo-hoz hasonló metamorfotikus változásokat mutattak, bár ezek a reakciók általában lassabban fejlődtek ki és gyengébbek voltak annál, mint ami in vivo tapasztalható.

Az in vitro nyert eredmények és az in vivo reakció közötti különbségek valószínűleg két lényeges tényezőre vezethetők vissza. Az egyik az in vitro kulturázási körülmények nem tökéletes volta, a másik pedig az állandó, magas hormonkoncentráció.

Egy szintetikus táptalaj sohasem lehet egyenértékű az állat saját hemolimfájával. Ezen úgy próbáltunk segíteni, hogy a lárva összes szövetét együtt, viszonylag kis térfogatban inkubáltuk /50 μ l/, és a táptalajt a kísérlet

időtartama alatt nem cseréltük. Feltételeztük, hogy a viszonylag nagy szövettömeg "kondicionálja" a táptalajt, és ennek során a szövetek olyan ismeretlen anyagokkal gazdagítják azt, amelyek elősegítik a szövetek életben maradását. Hasonló jelenséget figyelt meg pl. Oberlander /1976/, amikor az imágókorongokat a zsirtesttel együtt inkubálta. A kis térfogat ellenére a táptalaj láthatólag nem merült ki, és nem halmozódtak fel benne mérgező anyagcseretermékek sem, mert a nyelőcső az utóbél és a hátiedény még 5 hét inkubálás után is aktivan mozgott, és a szövetek csak kevéssé festődtek tripánkéekkel. A Malpighi-edények általában mindvégig jó állapotban maradtak, s ennek alapján feltételezhető a detoxifikálásban való részvételük. Talán ennek köszönhető, hogy a táptalaj még hosszú inkubálás után sem vált mérgezővé.

Az általunk kidolgozott in vitro rendszer ilyen szempontból hasonló a báb-állapothoz, amennyiben mindkettő zárt rendszer, és a környezetükkel csak gázcserét folytatnak.

A báb-élet alatt a Drosophila melanogaster-ben a β -ekdizon koncentrációja legalább kétszer erősen megemelkedik. Az első csucs a pupáriumképzéssel esik egybe, a második megelőzi az adult kutikula kiválasztását /Hodgetts és mtsai, 1977/. Mi 1 $\mu\text{g/ml}$ β -ekdizont adtunk a tápfolyadékhoz, ami kb. 10-szer magasabb, mint az in vivo koncentráció az első csucs alkalmával. Bár a szövetek valószínűleg inaktiválták a β -ekdizon egy részét, és így a kezdeti koncentráció fokozatosan csökkent, az

aktiv hormonkoncentráció azonban még 4 hét után is meghaladta az imágókorongok everziójához szükséges küszöbértéket. Élettani szempontból tehát küszöbértéknél állandóan magasabb β -ekdizon koncentráció állt fenn az inkubálás ideje alatt.

Richards /1976/ kísérletei azt mutatták, hogy az in vitro inkubált nyálmirigy-kromoszómákon a változatlan β -ekdizon koncentráció a prepupális puffsorozatnak csak az első felét képes indukálni. A teljes puffsorozat csak akkor fejlődik ki, ha a hormon koncentrációját az in vivo viszonyokhoz hasonlóan változtatták. Dübendorfer és Eichenberger-Glinz /1980/ is hasonló tapasztalt a Drosophila embrionális sejtekből indított kulturákban. Az in vitro differenciálódott sejtek metamorfózisát csak a β -ekdizon koncentrációjának változtatásával tudták indukálni. Lehetséges, hogy a β -ekdizon koncentráció változtatásával a mi in vitro rendszerünkben is esetleg további hormonválaszokat válthatnánk ki.

Amint az a 2. táblázatban látható, a metamorfózisos változások gyakorisága tekintetében határozott különbség van a hormont tartalmazó, vagy nem tartalmazó kulturákban. A kontroll kulturákban ilyen változásokat csak ritkán, hosszú inkubálási idő után figyeltünk meg és az csak az epidermisz leválására és gyenge tannelésére, illetve az utóbél belső kutikulájának a leválására korlátozódott. Mivel a kontroll állatokból a kulturák indítása előtt a gyűrümirigyet

mindig eltávolítottuk, így a kontrollban észlelt hormonhatást csak kétféleképpen magyarázhatjuk: a gyűrűmirigyen kívül más szerv is képes ekdizon szintézisre a lárvális testben;

a lárvális szövetek in situ a kulturák indítása előtt találtak a természetes ekdizonnal.

Több rovarfajban is kimutatták, hogy a test többi részétől, így a vedlési hormont termelő előtori mirigtől is elválasztott abdomen preparátumok képesek a radioaktívan jelzett koleszterolt α vagy β -ekdizonná alakítani /Nakanishi és mtsai, 1972; Hsiao és mtsai, 1975/. Studinger és Willig /1975/ kimutatták, hogy Musca domestica lárvális abdomenjében az oenociták képesek a fent említett reakcióra. Az oenociták a mi rendszerünkben is jelen voltak, és az alkalmazott in vitro körülmények legalábbis a gyűrűmirigy esetében megengedték a hormontermelést, mert a β -ekdizon nélkül, de több gyűrűmiriggyel együtt kulturázott szövetek is mutattak hormon-indukálta elváltozásokat. Ha tehát a Drosophila oenocitái is képesek korlátozott hormon szintézisre, akkor a kontroll kulturákban is felhalmozódhat bizonyos mennyiségű β -ekdizon. Az a tény, hogy a metamorfózisos változásokat csak hosszú inkubálási idő után figyeltük meg, mindenképpen alacsony β -ekdizon koncentrációra utal.

A másik lehetőség az, hogy a szövetek már a kultura készítése előtt találtak a saját gyűrűmirigy

által termelt ekdizonnal. Kulturáinkhoz vándorló lár-
vákat boncoltunk, de szigoruan csak azokat az állato-
kat használtuk fel, amelyekben a nyálmirigy szekrétu-
mának a lumenbe történő kiválasztása még nem kezdődött
meg. Boyd és Ashburner /1977/ szerint ehhez a nyálmi-
rigyet legalább 4 óráig kell β -ekdizon jelenlétében
inkubálni. Feltételezhető tehát, hogy a szöveteket
már in situ is érhetette néhány óráig tartó β -ekdizon
hatás, bár ez még a nyálmirigy állapotán nem látszott.

Bármelyik is legyen az oka a kontroll kulturákban
tapasztalt gyenge hormon hatásnak, ez mindig ugyanazok-
ra a szövetekre korlátozódott, amiből e szöveteknek
a többiétől eltérő, magas ekdizon érzékenységre kö-
vetkeztethetünk.

4.2. A nem bábozódó és későn bábozódó mutáns szövetek viselkedése az in vitro rendszerben

Amint az a 3. és 4. táblázatban látható, az
l(1)npr-3, l(1)lpr-1 és -2 mutánsok szövetei a vad ti-
pushoz hasonlóan viselkedtek az in vitro rendszerben,
vagyis a β -ekdizon jelenlétében ugyanazokat a metamor-
fózisos változásokat mutatták. Ez összhangban van
azokkal az adatokkal, amelyek szerint egyrészt a mu-
tációkat mozaikos formában hordozó egyedek nem képez-
tek lárva-báb gynandert, másrészt vad típusu gyűrűmi-
rigynek mutáns lárvába történő beültetésével pupárium-
képzést és szöveti metamorfózist lehetett indukálni

/Kiss és mtsai, 1978/. Mindhárom módszerrel kapott eredmények támogatják azt a következtetést, hogy a metamorfózis hiányáért, illetve késéséért ezekben a mutánsokban a vedlési hormon alacsony szintje a felelős.

Az $\lambda(1)npr-1$ számos eltérést mutatott az előzőekhez képest. A mutáns szövetei a hormon nélküli kontrollban is mutattak ekdizon indukálta változásokat, ezek gyakorisága annál nagyobb volt, minél idősebb lárvából készült a kultúra, és 8 napos lárváknál elérte a 100%-ot. Mivel ezek a változások hosszabb idő után in vivo is megfigyelhetők a mutáns lárvákban, a jelenleg legvalószínűbb magyarázata az, hogy a 4 napnál idősebb mutáns lárvákban is termelődik, illetve felhalmozódik ekdizon. Ezt a feltételezést alátámasztja a radioimmun-módszerrel 5-6 napos lárvákban mért magas hormon koncentráció /Maróy Péter; nem közölt adat/, bár technikai okokból nem lehetett eldönteni, hogy ez az α vagy β módosulat volt-e.

A metamorfotikus változások egy része a hormon tartalmu tápoldatban is igen gyenge, kezdeti formában megállt. Így nagyon gyenge maradt a lárvális kutikula szklerotizációja, az imágókorongok everziója torz volt és belül maradt a peripodiális membránon, az utóbél mozgásának gátlása sem volt teljes. A zsirtest egyes sejtekre történő szétesését sem sikerült megfigyelni. Normálisan végbement viszont a lárvális epidermisz és az utóbél kutikulájának az apolizise.

Az l(1)npr-1 mutánsban a vad típusu gyűrűmirigy beültetése nem indukált sem pupáriumképzést, sem egyéb metamorfózisos változást, ugyanakkor a gynander-mozaik tesztben lárva-báb gynandereket képzett /Kiss és mtsai, 1978/. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a mutáció hatása /a metamorfózis gátlása/ autonóm módon nyilvánul meg a vizsgált szövetekben.

Ebből arra következtethetünk, hogy az l(1)npr-1-ben a mutáció egy olyan génben következett be, amely sokféle szövetben működik egyszerre, és kulcsfontosságú a szöveti metamorfózis megindulásában, a β -ekdizon által indukált reakciók kifejlődésében. E feltételezést alátámasztja az is, hogy a mutáns a 2B5-6 régióban helyezkedik el, amely egyike az un. korai ekdizon specifikus puffrégióknak /Belyaeva és mtsai, 1980/.

4.3. A lárvális kutikula tanelését befolyásoló tényezők

Riddiford munkacsoportjának Manduca epidermisszel végzett in vitro kísérletei azt mutatják, hogy a szklerotizáció mértékét az O_2 -ben gazdag atmoszféra erősen megnöveli /Fain, Riddiford, 1977; Riddiford és mtsai, 1980/. Ugyanezt tapasztaltuk Drosophila lárvák esetében is. Levegőn, 1 μ g/ml β -ekdizon jelenlétében a testfal csak igen lassan, 5-6 nap alatt barnult meg és akkor is csak kisebb-nagyobb foltokban. Ezzel szemben a

70% O_2 -t tartalmazó atmoszférában 2 nap inkubálás után az egész testfaldarabra kiterjedő igen erős barnulást figyeltünk meg. Ilyen körülmények között a szklerotizációt indukáló β -ekdizon-küszöbkoncentráció értéke 0,01 $\mu\text{g/ml}$ -nek adódott, amely megegyezik a Fristrom és munkatársai /1973/ által Drosophila imágókorongok everziójára meghatározott értékkel. Magasabb hormonkoncentráció hatására a szklerotizáció mértéke és sebessége is megnőtt /9 és 10. ábra/.

A közép-harmadik stádiumu lárvák esetében a szklerotizáció erőssége és sebessége is kisebb volt az érett lárváéhoz viszonyítva, a folyamat tehát függ a lárva korától is. Kísérleteinkben azt találtuk, hogy a harmadik stádiumba való vedlés idejéből vett lárvák testfalkulturáiban a kulturák 15%-a már képes volt a kutikula szklerotizációra β -ekdizon jelenlétében. Mivel közép-harmadik stádiumu testfalkulturákban ez az arányszám 100%-ra nő, feltételezhetjük, hogy az epidermisz sejteknek kompetenssé kell válniuk a β -ekdizon indukálta szklerotizációra. Ennek alapján úgy gondoljuk, hogy az említett kísérletben a testfalkulturák 15%-a harmadik stádiumu lárvából készült és ezért tannelt, 85%-a pedig még második stádiumu volt és ezért nem reagált a hormonra. Adataink alapján feltételezhetjük, hogy az epidermiszsejtek a harmadik stádiumba történő vedlést követően válnak a hormon-válaszadásra képessé. Ennek megerősítésére azonban további kísérletek szükségesek. Riddiford szerint a Manduca epidermisz sejtek az

utolsó lárvastádium első felében egy kisebb ekdizon-titer emelkedés hatására válnak kompetenssé a báb-kutikula képzésére. /Riddiford, 1976; Riddiford és mtsai, 1980/. Érdekes ebben a vonatkozásban, hogy Berreur és munkatársai egy hasonló ekdizon-titer emelkedést mértek a Drosophila harmadik lárvastádiumának elején /Berreur és mtsai, 1979/. Amennyiben e megfigyelés reális, elképzelhető, hogy a pupáriumképzésre való kompetenciát ez a kis ekdizon-csucs hozná létre.

A különböző gátlószerekkel végzett kísérleteink szerint a lárvális kutikula szklerotizációjához RNS és fehérje szintézisre van szükség. Irodalmi adatok szerint az epidermisz sejtekben β -ekdizon hatására dopa-dekarboxiláz szintetizálódik de novo /Kraminsky és mtsai, 1980/, amely az N-acetil-dopamin szintézisében kulcsszerepet játszik. Ez a magyarázata annak, hogy az RNS és fehérje szintézis gátlásakor az in vitro kulturákban nem kaptunk szklerotizációt. Az oligomicin, amely szétkapcsolja az oxidatív foszforilációt, szintén gátolja a szklerotizációt, tehát a folyamat energiaigényes. Ezt részben az RNS és fehérjeszintézis indokolja, de pl. az N-acetil-dopaminnak a kutikulába történő transzportja is energiaigényes folyamat lehet. Meglepő módon az α -metil-dopa, a dopa-dekarboxiláz specifikus inhibitora csak viszonylag magas koncentrációnál okozott gyenge gát-

lást. Ennek magyarázatát nem tudjuk, elképzelhető, hogy az in vitro rendszerben nem tudott a sejtekbe jutni és ezért nem fejthette ki gátló hatását. A colcemid és a citokalazin B nem gátolja a tanelést, ezek szerint a mikrotubulusok és mikrofilamentumok épsége nem lényeges a szklerotizáció során.

Amint az már az irodalmi áttekintésben is szerepelt, a rovarkutikula szklerotizációja történhet kinoidális strukturák kialakítása útján, vagy β -szklerotizációval /Andersen, 1974; 1979/, /5. oldal/. Mindkét esetben az N-acetil-dopamin a kulcsfontosságú vegyület, amelynek aktiválása a kutikulában történik. Mivel az aktiválást végző enzimek már a nem szklerotizált kutikulában is jelen vannak, így a csupasz /epidermisz sejtektől megtisztított/ kutikula szklerotizációja is indukálható in vitro körülmények között N-acetil-dopamin jelenlétében inkubálva. Ez különösen a $\ell(1)npr-1$ epidermisz hormon-válaszának vizsgálatában nyújtott nagy segítséget. Ugyanis e mutáns lárvális testfala β -ekdizon jelenlétében nem szklerotizált, a csupasz mutáns kutikula azonban az N-acetil-dopamint tartalmazó táptalajban a vad típuséhoz hasonlóan erősen megbarnult és megkeményedett. Így valószínűsíthetjük, hogy a $\ell(1)npr-1$ mutáns esetében a pupáriumképzés hiányának oka nem a lárvális kutikulában lévő proteinek hibája, hanem inkább az N-acetil-dopamin elégtelen termelésében keresendő.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

Disszertációmban egy olyan in vitro rendszert mutatok be, amelyben a Drosophila melanogaster lárvális szövetein a vedlési hormon/ β -ekdizon/segítségével a metamorfózis bizonyos lépései reprodukálhatók. A vad típusu lárvákból készült szervkulturákban a lárvális szervek hormon nélküli táptalajban hosszú ideig életben tarthatók és metamorfózisos változásokat nem mutatnak. β -ekdizon jelenlétében a következő szövet-specifikus változásokat sikerült kiváltani : a kutikula megbarnult és megkeményedett, a lárvális epidermisz és az izmok leváltak a szklerotizálódott kutikuláról, a zsirtest egyes sejtekre esett szét, az utóbél mozgása megszűnt, és belső kutikula bélése apolizált, az imágókorongok evertáltak és epidermisz-sejtjeik báb, illetve adult kutikulát választottak ki. Az in vitro kiváltott metamorfózisos változások az imágókorongokra vonatkozó kivételével ujnak számítanak az irodalomban.

A kidolgozott rendszerben két nem bábozódó / $\ell(1)npr-1$ és -3 / és két későn bábozódó / $\ell(1)lpr-1$ és -2 / mutáns lárvális szöveteinek hormonválaszát vizsgáltuk. Az $\ell(1)npr-3$ és a két lpr mutáns szövetei az in vitro β -ekdizon stimulusra a vad típushoz hasonló változásokat mutattak. E mutánsok esetében a metamor-

fózis hiányát, illetve késését valószínűleg a β -ekdizon hiánya okozza. Az l(1)npr-1 esetében a hormon egyáltalán nem, vagy csak a mutánsra jellemző korlátozott formában indukált metamorfózisos változásokat. E mutánsban a metamorfózis gátlása külső hormon adagolással sem szüntethető meg, tehát a mutáció több szövetben is autonóm módon nyilvánul meg.

A kidolgozott in vitro rendszer alkalmas a metamorfózis bevezető lépésének, a pupáriumképzésnek részletes tanulmányozására, a lárvális kutikula barnulását és megkeményedését befolyásoló tényezők vizsgálatára is.

A dolgozatom anyagából a következő közlemények jelentek meg :

1. Kiss, I., Molnár, I. /1979/ Metamorphic changes of Drosophila larval tissues induced by β -ecdysone in vitro. Proceedings of Sixth European Drosophila Research Conference 1979.
2. Molnár, I., Kiss, I. In vitro tanning of Drosophila larval cuticle. Proceedings of Sixth European Drosophila Research Conference 1979.
3. Kiss, I., Molnár, I. /1980/. Metamorphic changes of wild type and mutant Drosophila tissues induced by ecdysone in vitro. J. Insect. Physiol. 26, 391-401.
4. Molnár, I., Kiss, I./1980/ An easy method for rearing axenic Drosophila lines. Dros. Inf. Serv. 55, 163-164.

6. IRODALOMJEGYZÉK

1. Andersen, S.O. /1974/ Evidence for two mechanisms of sclerotization in insect cuticle. *Nature* 251, 507-508.
2. Andersen, S.O. /1979/ Biochemistry of insect cuticle. *Ann. Rev. Entomol.* 24, 29-61.
3. Anderson, D.T. /1972/ The development of Holometabola Insects. In: *Developmental systems: Insects*. Eds. Counce and Waddington, Academy Press, 1972. London.
4. Ashburner, M. /1972/ Patterns of puffing activity in the salivary gland chromosomes of Drosophila. VI. Induction by ecdysone in salivary glands of D.melanogaster cultured in vitro. *Chromosoma* 38, 255-281.
5. Ashburner, M. and 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.
6. Belyaeva, E.S. and Zhimulev, I.F. /1976/ RNA synthesis in the Drosophila melanogaster puffs. *Cell Differ.* 415-427.
7. Belyaeva, E.S., Aizenzon, M.G., Semeshin, V.F., Kiss, I., Bariteva, E., Koczka, K., Zhimulev, I.F. /1980/ Cytogenetic analysis of the 2B1-2 - 2B9-10 region of the X chromosome of Drosophila melanogaster. *Cytology of the region and mutant complementation groups*. *Chromosoma* /megjelenés alatt/.
8. Berreur, P., Porcheron, P., Berreur-Bonnenfant, J., Simpson, P. /1979/ Ecdysteroid levels and pupariation in Drosophila melanogaster. *J. Exp. Zool.* 210, 347-352.
9. Berrill, N.J., Karp, G. /1976/ In "Development" Eds. Berrill, Karp. 472-485.
10. Bodenstern, D. /1950/ In "Biology of Drosophila" Eds. Demerec, M. John Wiley and Sons Inc., London, Chapman and Hall Ltd.
11. Bollenbacher, W.E., Vedeckis, W.V., Gilbert, L.I., and O'Connor, J.D. /1975/ Ecdysone titers and prothoracic gland activity during the larval-pupal development of Manduca sexta. *Dev. Biol.* 44, 46-53.
12. Boyd, M. and Ashburner, M. /1977/ The hormonal control of salivary gland secretion in Drosophila melanogaster: studies in vitro. *J. Insect Physiol.* 23, 517-523.

13. Butterworth, F.M., La Tendresse, B.L. /1973/ Quantitative studies of cytochemical and cytological changes during cell death in the larval fat body of Drosophila melanogaster. J. Insect. Physiol. 19, 1487-1499.
14. Butterworth, F.M., Tysell, B., Waclawski, I. /1979/ The effect of 20-hydroxyecdysone and protein on granule formation in the in vitro cultured fat body of Drosophila. J. Insect Physiol. 25, 855-860.
15. Clever, U. and Karlson, P. /1960/ Induktion von Puff-Veränderungen in den Speicheldrüsenchromosomen von Chironomus tentans durch Ecdyson. Expl. Cell Res. 20, 623-626.
16. Dübendorfer, A., Eichenberger-Glinz, S. /1980/ Development and metamorphosis of larval and adult tissues of Drosophila in vitro. In "Invertebrate Systems In Vitro" Eds. Kurstak, Maramorosch, Dübendorfer. Elsevier, North-Holland Biomedical Press.
17. Ephrussi, B., Beadle, G. /1936/ A technique of transplantation for Drosophila. Amer. Naturalist 70, 218-225.
18. Fain, M.J., Riddiford, L.M. /1975/ Juvenile hormone titers in the Hemolymph during late larval development of the tobacco hornworm Manduca sexta, Biol. Bull. 149, 506-521.
19. Fain, M.J., Riddiford, M.L. /1977/ Requirements for moulting of the chrochet epidermis of the tobacco hornworm larva in vivo and in vitro. Wilhelm Roux's Archives 181, 285-307.
20. Fekete, É., Fristrom, D., Kiss, I., Fristrom, J.W. /1975/ The mechanism of evagination of imaginal discs of Drosophila melanogaster. Studies on trypsin accelerated evagination, Wilhelm Roux's Arch. Entw. Mech. Org. 178, 123-138.
21. Fristrom, J.W., Logan, W.R., Murphy, C. /1973/ The synthetic and minimal culture requirements for evagination of imaginal discs of Drosophila melanogaster in vitro. Dev. Biol. 33, 441-450.
22. Fristrom, J.W., Gregg, T.L., Siegel, J. /1974/ The effect of β -ecdysone on protein synthesis in imaginal discs of Drosophila melanogaster cultured in vitro. I. The effect on total protein synthesis. Dev. Biol. 41, 301-313.
23. Fristrom, J.W., Yund, M.A. /1976/ Characteristics of the action of ecdysones on Drosophila imaginal discs cultured in vitro. In "Invertebrate Tissue Culture Research Applications". K.Maramorosch, Ed. New York. Academic Press, 161-178.
24. Fristrom, D., Fristrom, J.W. /1975/ The mechanism of evagination of imaginal disc of Drosophila melanogaster. Dev. Biol. 43, 1-23.
25. Gersh, E.S. /1975/ Sites of gene activity and of inactive genes in polytene chromosomes of Diptera. J. Theor. Biol. 50, 413-428.
26. Grace, T.D.C. /1962/ Establishment of four strains of cells from insect tissues grown in vitro. Nature, /Lond./ 195, 788-789.

27. Groenmeyer, H., Pongs, O. /1980/ Localization of ecdysterone on polytene chromosomes of Drosophila melanogaster. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, No. 4. 2108-2112.
28. Hackman, R.H., Goldberg, M. /1977/ Molecular cross-links in cuticles. Insect Biochem. 7, 175-184.
29. Henrikson, P.A. Clever, U. /1972/ Protease activity and cell death during metamorphosis in the salivary gland of Chironomus tentans. J. Insect. Physiol. 18, 1981-2004.
30. Hodgetts, R.B., Sage, B. and O'Connor, J.D. /1977/ Ecdysone titers during post-embryonic development of Drosophila melanogaster. Dev. Biol. 60, 310-317.
31. Hsiao, T.H., Hsiao, C. and De Wilde, J. /1975/ Moulting hormone production in the isolated larval abdomen of the Colorado beetle. Nature 255, 727.
32. Karlson, P. and Sekeris, C.E. /1964/ Biochemistry of insect metamorphosis. Comparative Biochemistry /Florkin, M. and H.S.Mason, eds./ Vol. 6, Academic Press, New York, San Francisco, London; 221-243.
33. Kiss, I., Szabad, J., Gausz, J., Fekete, É., Szidonya, J., Maróy, P., Fodor, A., Bencze, G. /1976/ Isolation and characterisation of X-linked lethal mutations affecting differentiation of the imaginal disc in Drosophila melanogaster. Theoretical and Applied Genetics 48, 217-226.
34. Kiss, I., Szabad, J. and Major, J. /1978/ Genetic and developmental analysis of puparium formation in Drosophila. Molec. Gen. Genet. 164, 77-83.
35. Kiss, I. and Williams, C.M. /1976/ Role of a macromolecular factor in the spermatogenesis of silkmths. Invertebrate Tissue Culture /E.Kurstak and K.Maramorosch, eds./ Academic Press, Inc. New York, San Francisco, London, 173-177.
36. Klose, W. és munkatársai /1980/. Megjelenés alatt.
37. Kraminsky, G., Clark, W.C., Estelle, M.A., Gietz, R.D., Sage, B.A., O'Connor, J.D., Hodgetts, R.B. /1980/ Induction of translatable mRNA for dopa decarboxilase in Drosophila. An early response to ecdysterone. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, No. 7. 4175-4179.
38. Kuroda, Y., Yamaguchi, K. /1956/ The effects of the cephalic complex upon the eye disc of Drosophila melanogaster. Jap. J. Genet. 31, 98-103.
39. Leloup, A.M. /1976/ Insect spermatogenesis in vitro. In "Invertebrate Tissue Culture" Eds. K.Maramorosch, E.Kurstak.
40. Mandaron, P. /1970/ Développement in vitro des disques imaginaux de la Drosophile. Aspects morphologiques et histologiques. Dev. Biol. 22, 298-320.
41. Mandaron, P., Guillermet, C., Sengel, P. /1977/ In vitro development of Drosophila imaginal discs: hormonal control and mechanism of evagination. Amer. Zool. 17, 661-670.

42. Maranda, B. and Hodgetts, R. /1977/ A characterization of DOPAmine acetyltransferase in Drosophila melanogaster. Insect Biochem. 7, 33-43.
43. Maróy, P., Koczka, K., Fekete, É. and Vargha, J. /1980/ Moulting hormone titer of Drosophila melanogaster larvae. Dros. Inf. Serv. 55, 98-99.
44. Meynadier, T. /1971/ In "Invertebrate tissue culture", Eds. C.Vago, I., 141.
45. Milner, M.J., Sang, J.H. /1973/ Relative activities of α -ecdysone and β -ecdysone for the differentiation in vitro of Drosophila melanogaster imaginal discs. Cell 3, 141-143.
46. Molnár, I. and Kiss, I. /1980/ An easy method for rearing axenic Drosophila lines. Dros. Inf. Serv. 55, 163-164.
47. Nakanishi, I., Moriyama, H., Okauchi, T., Fujioka, S. and Koreeda, M. /1972/ Biosynthesis of α - and β -ecdysones from cholesterol outside the prothoracic gland in Bombyx mori. Science /Wash./ 176, 51-52.
48. Oberlander, H. /1976/ Dissociation and reaggregation of fat body cells during insect metamorphosis. See. Ref. 48, 241-246.
49. Poodry, C.A., Schneiderman, H.A. /1970/ The ultrastructure of the developing leg of Drosophila melanogaster. Wilhelm Roux's Arch. Entw. Mech. Org. 166, 1-44.
50. Posthethwait, J.H. /1974/ Juvenile hormone and the adult development of Drosophila. Biol. Bull. 147, 119-135.
51. Radford, S.V., Misch, D.W. /1971/ The cytological effect of ecdysterone on the midgut cells of the flesh-fly Sarcophaga bullata. J. Cell Biol. 49, 702-711.
52. Richards, G. /1976/ Sequential gene activation by ecdysone in polytenchromosomes of Drosophila melanogaster. IV. The mid prepupal period. Dev. Biol. 54, 256-263.
53. Richards, G.P. /1978/ The relative biological activities of α - and β -ecdysone and their 3-dehydro derivatives in the chromosome puffing assay. J. Insect Physiol. 24, 329-335.
54. Riddiford, L.M. /1976/ Juvenile hormone control of epidermal commitment in vivo and in vitro. The Juvenile Hormones /L.I.Gilbert, ed./ 198-219. Plenum Press, New York.
55. Riddiford, L.M. and Truman, J.W. /1978/ Biochemistry of insect hormones and insect growth regulators. Biochemistry of Insects, Academic Press, New York, San Francisco, London; 307-357.
56. Riddiford, L.M., Kiguchi, K., Roseland, C.R. Chien, A.C., Wolfgang, W.J. /1980/ Cuticle formation and sclerotization in vitro by the epidermis of the tobacco hornworm Manduca sexta. In "Invertebrate Systems In Vitro" Eds. Kurstak, Maramorosch, Dübendorfer. Elsevier /North-Holland Biomedical Press.

57. Sass, M., Kovács, J. /1975/ Ecdysterone and an analogue of juvenile hormone on the autophagy in the cells of fat body of Mamestra brassicae. Acta Biol. Acad. Sci. Hung. 26, 189-196.
58. Schneider, I. /1967/ Insect tissue culture. In "Methods in developmental biology" Eds. N.Wilt and I.Wessels. Crowel, New York.
59. Sengel, P., Mandaron, P. /1969/ Aspects morphologiques du development in vitro des disques imaginaux de la Drosophile. C.R. Acad. Sci. Ser. D. 268, 405-407.
60. Shields, G., Dübendorfer, A., Sang, J.H. /1975/ Differentiation in vitro larval cell types from early embrionic cells of Drosophila melanogaster. J. Embriol. exp. Morph. 33, 159-175.
61. Studinger, G. and Willig, A. /1975/ Biosynthesis of α - and β -ecdysone in isolated abdomens of larvae of Musca domestica. J. Insect Physiol. 21, 1793-1798.
62. Sturtevant, A.H. /1929/ The claret mutant type of Drosophila stimulans a study of chromosome elimination and of cell-lineage. Z. Wiss. Zool. 135, 323-356.
63. Ursprung, H., Sofer, W.H., Bunoughs, V. /1970/ Ontogeny and tissue distribution of alcohol dehydrogenase in Drosophila melanogaster. Wilhelm Roux's Arch. Entw. Mech. Org. 164, 201-207.
64. Ursprung, H., Nöthiger, R. /1972/ The biology of imaginal discs. Result and problems in cell differentiation. Vol. 5. 98-108. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 1972.
65. Wyatt, U. /1956/. Culture in vitro of tissue from the silkworm Bombyx mori L. J. Gen. Physiol. 39, 841.
66. Zdarek, J. and Fraenkel, G. /1971/ Neurosecretory control of ecdysone release during puparium formation of flies. Gen. Comp. Endocrinol. 17, 483-489.
67. Zdarek, J. and Fraenkel, G. /1972/ The mechanism of puparium formation in flies. J. Exp. Zool. 179, 315-321.