

„Transz-reguláció a *Drosophila melanogaster* Abd-B doménjében”

Ph.D. értekezés

készítette: *Sipos László*

témavezető: *Dr. Gyurkovics Henrik*

MTA Szegedi Biológia Központ

Genetika Intézet

1997

Értekezésemet szeretettel ajánlom feleségemnek, *Gyarmati Teréz*-nek

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A legnagyobb köszönettel és hálával mesteremnek, *Dr. Gyurkovics Henrik*-nek tartozom, aki egyetemista korom óta témavezetőm volt. Módszertani és elméleti alapismereteim zömét Tőle kaptam, döntő hatással volt tudományos világképem és gondolkodásmódom kialakulására is.

Köszönöm *Dr. Gausz János* csoportvezetőnek, hogy lehetővé tette számomra azt, hogy tudományos diákkörös egyetemistaként majd segédmunkatársként résztvehessek a csoportjában végzett kutatásokban. Éveken keresztül figyelemmel kísérte munkámat és egyengette utamat.

Köszönöm *Apátiné Kiss Anita*, *Csendes Tiborné* és *Dongóné Gyányi Edit* asszisztenseknek a pontos és lelkiismeretes munkájukat, mellyel nagyban hozzájárultak kísérleteim sikeréhez.

Köszönöm *Dr. François Karch* külföldi együttműködő partnerünknek, hogy genfi laboratóriumában elsajátíthattam a *Drosophila*-embriók immun-hisztokémiai vizsgálatához szükséges elméleti és gyakorlati ismereteket.

Köszönöm *Mihály József*-nek, hogy segítségemre volt a molekuláris munkák elvégzése során.

Köszönöm *Messerné Bajusz Izabella*, *Blastyák András* és *Dr. Györgypál „Csövi” Zoltán* kollégáimnak, hogy hasznos tanácsokkal láttak el kéziratom olvasása során.

Köszönöm a két másik „*drosis*” csoport vezetőinek, *Dr. Erdélyi Miklós*-nak

és *Dr. Kiss István*-nak, valamint csoportjuk összes tagjának, hogy mindig segítségemre voltak.

Köszönöm *Dr. Maróy Péter* tanszékvezetőnek és a *JATE Genetika Tanszék* minden munkatársának, különösen *Dr. Szidonya János*-nak, hogy lehetővé tették számomra a mikroszkópos felvételek digitalizálását.

TARTALOMJEGYZÉK

	Oldal
1. BEVEZETÉS	10
1.1. Általános bevezetés és célkitűzés	10
1.2. Irodalmi áttekintés	14
1.2.1. A szomatikus párosodás és a transzvekción története	14
1.2.1.1. A <i>cubitus-interruptus</i> (<i>ci</i>) gén	15
1.2.1.2. A <i>brown</i> (<i>bw</i>) gén	16
1.2.1.3. A <i>bithorax</i> (<i>bx</i>) lokusz és <i>E. Lewis</i>	17
1.2.1.4. A <i>Contrabithorax</i> (<i>Cbx</i>) mutációk	19
1.2.1.5. A <i>yellow</i> (<i>y</i>) gén	21
1.2.1.6. A <i>zeste-white</i> kölcsönhatás	22
1.2.1.7. A <i>zeste</i> (<i>z</i>) gén szerepe a transzvekciónban	24
1.2.1.8. A szomatikus párosodás és a transzvekción előfordulása más élőlényekben	27
1.2.2. Mikor jön létre a transzvekción?	29
1.2.3. A homológok párosodásának szerepe, a transzvekción jelentősége	30
2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	35
2.1. <i>Drosophila</i> tenyészet és törzsek	35
2.2. Általános módszerek	35
2.3. <i>Drosophila</i> embriók immun-hisztokémiai festése	36
2.4. Rekombinációval előállított kromoszómák	37
2.4.1. <i>Fab-7Abd-B^{D16}</i>	37
2.4.2. <i>Mcp^{B116}iab-7^{Sz}Abd-B^{D16}</i>	38
2.5. <i>R5^LR7^R</i>	40
2.5. A transz-szuppressziót megszüntető kromoszómális átrendeződések izolálása	41
2.5.1. <i>TSR, Fab-7</i> kromoszómák	41
2.5.2. <i>TSR, Fab-7Abd-B^{D16}</i> kromoszómák	42
2.6. Új deléciónk izolálása az <i>Abd-B</i> génen belül P elem újbóli mobilizációja révén	43

3. EREDMÉNYEK	46
4. AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA	73
5. ÖSSZEFOGLALÁS	90
6. ANGOL NYELVŰ ÖSSZEFOGLALÓ	95
7. FÜGGELÉK	101
7.1. Tudományos háttér	101
7.1.1. Miért használnak ecetmuslicát a genetikai kísérletekben?	101
7.1.2. Az óriáskromoszómák szerveződése	103
7.1.3. A <i>Drosophila melanogaster</i> peteképződése és egyedfejlődése	106
7.1.4. A <i>Drosophila melanogaster</i> egyedfejlődését szabályozó fő géncsoportok	108
7.1.5. A felnőtt <i>Drosophila melanogaster</i> testszelvényeinek morfológiája	110
7.1.6. A <i>bithorax-komplex</i> szerkezete, működési modellje és szabályozása	114
7.1.7. Az <i>Abd-B</i> domén működése, a <i>Fab-7</i> és az <i>iab-7^{Sz}</i> mutáció	122
7.1.8. A <i>Drosophila</i> -genetikában használt alléltípusok	126
8. KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE	128
9. IRODALOMJEGYZÉK	129

1. BEVEZETÉS

1.1. Általános bevezetés és célkitűzés

Az eukarióta élőlények örökítő anyaga kromoszómákra tagolódik. A kromoszómák anyaga, a kromatin, a DNS mellett fehérjéből és kismennyiségű RNS-ből épül fel. Számos kísérleti adat és megfigyelés igazolja, hogy ennek a nukleoprotein összetételű anyagnak rendkívül bonyolult, a sejt élete során folytonosan változó térbeli szerkezete van.

Ha kivonnánk egy emberi sejtől a DNS-t és minden egyes molekulát egymás végéhez ragasztanánk, akkor egy körülbelül 2 méter hosszú kettős spirált kapnánk (Evans, 1977). Hogy ez a hatalmas mennyiségű DNS elfér a sejtmagban, annak köszönhető, hogy a DNS különböző szerveződési szinteken (nukleoszóma, szolenoid, szuperszolenoid) többszörösen feltekeredik. Az interfázisos kromoszómák szerkezete még tovább tömörödik a sejtosztódás során: ha a metafázisos kromoszóma-garnitúrát ragasztjuk össze egyetlen szalaggá, annak csupán 150 μm lenne a hossza (Du Praw és Bahr, 1969). Ez a tömör szerkezet teszi lehetővé, hogy a kromoszómák el tudjanak egymástól különülni sejtosztódáskor.

Más kromatin-szerkezeti változások a génműködés szabályozásában töltenek be fontos szerepet. Például az ún. „heterokromatinizáció” révén az emlősökben a nőnemű egyedek két X kromoszómája közül az egyik inaktiválódik, ezáltal lesz azonos az X kromoszómáról származó géntermékek mennyisége mindkét nemből.

(Lyon, 1961). Az inaktív X kromoszóma erősen festődő, a maghártya belső oldalához tapadó heterokromatikus röggként látható az interfázisos sejtmagban (ún. *Barr*-test vagy szex-kromatin). A heterokromatint erős festődése alapján tömörebb szerkezetűnek tartják, mint a gyengébben festődő eukromatint. Ezek alapján feltehetnénk, hogy a heterokromatinban nem működő, míg az eukromatinban működő gének találhatóak, ugyanis a lazább kromatin-szerkezet kedvez annak, hogy a gének átíródásában résztvevő fehérjék hozzáférjenek a DNS-hez. Ez a feltevés azonban csak részben igaz: egyrészt vannak olyan kromoszóma-szakaszok, melyek csak időszakosan heterokromatikusak (ún. fakultatív heterokromatin), másrészt nem minden eukromatikus kromoszóma-szakaszon elhelyezkedő gén aktív.

A génműködés szabályozása során a kromatin szerkezete nemcsak tömörödni, hanem fellazulni is képes. Erre jó példa a kétszárnyú rovarok lárvális nyálmirigysejtjeiben megfigyelt „kromoszóma-puffok” kialakulása. Az ezekben a sejtekben található politén óriáskromoszómák jellegzetes sávos mintázatúak, ami az eltérő szerkezetű eukromatikus kromoszóma-szakaszok váltakozásának a következménye. Egyes sávok a fejlődési állapottól függően eltűnnek, ugyanakkor az adott kromoszóma-szakasz oldalirányba kiszélesedik, szerkezete fellazul, úgynevezett „kromoszóma-puffok” jönnek létre. A puffokban intenzív RNS-szintézis történik.

Egy másik érdekes sajátossága a *Diptera* fajok kromoszómáinak, hogy a szomatikus sejtekben az apai és anyai eredetű homológ kromoszómák párosodnak, teljes hosszukban egymáshoz tapadnak (Metz, 1916). Noha a pontos okát ma sem ismerik, úgy vélik, hogy a párosodás nem egyszerűen a DNS-homológia, hanem a

hasonló kromatin-szerkezet következménye. Joggal merül fel a kérdés, hogy ha a két homológ ilyen szorosan egymás mellett helyezkedik el, vajon befolyásolja-e az egyik kromoszómán lévő gének működése a homológ kromoszóma azonos génjeinek működését? Ennek a lehetőségére utal az az érdekes megfigyelés, melyet az ecetmuslica (*Drosophila melanogaster*) lárvájának politén nyálmirigy-sejtjeiben írt le *Ashburner* (1967). Két különböző muslicatorzs (beltenyésztett vonal) közül az egyikben egy adott kromoszóma-szakaszon megfigyelhető volt a már fent említett puff, míg a másik törzs egyedeiben nem. Ha a két különböző törzsből származó egyedeket keresztezte egymással, az így kapott hibrid utódok mindkét homológ kromoszómáján kialakult a puff, hasonlóan az egyik szülői törzshöz. Ezzel ellentétben, ha a hibridekben valamilyen kromoszómális átrendeződés (például transzpozíció) következtében nem tudott párosodni egymással a két homológ kromoszóma az adott régió területén, akkor csak az egyik kromoszómán alakult ki puff.

Számos ehhez hasonló eset ismert az ecetmuslicában, amikor a génműködés megváltozik (és fenotípusos következménnyel jár) attól függően, hogy a homológ kromoszómák párosodása gátolt, avagy nem. Ezt a jelenséget **transzvekciónak** nevezik (*Lewis*, 1954). Egyre több adat utal arra, hogy a homológ kromoszómák szomatikus párosodása és a transzvekciónak nem kizárólag az ecetmuslica sajátossága, hanem növényekben, állatokban és emberben is előfordulhat (lásd **1.2.1.7.** fejezet). Így e két biológiai jelenség tanulmányozása során számos új, általános érvényű ismeretre tehetünk szert az eukarióta génműködés-szabályozás és a magasabbrendű kromatinszerkezet területén.

Értekezésem egy transzvekción alapuló jelenség vizsgálatáról szól, melyet mi mutattunk ki a *Drosophila melanogaster* egyik ún. „homeotikus” génje, az *Abd-B* esetében. Kutatásunk abból a kezdeti megfigyelésből indult ki, hogy a domináns *Fab-7* mutáció okozta jellegzetes fenotípus (a hatodik potrohszelvény hetedikké módosul) részlegesen visszaszorul, ha a párosodó, homológ kromoszómán lévő (transz-helyzetű) *Abd-B* gén mutációt hordoz. A *Fab-7* mutáció segítségével, elsősorban genetikai módszerekkel részletesen tanulmányoztuk az általunk kimutatott transzvekción az egyedfejlődés két fontos stádiumában, különböző szövetekben: az embrionális mezo- és ektodermában, valamint központi idegrendszerben (CNS), és az adult kültakarón (kutikulán). Tudományos célul az *Abd-B* doménben észlelt transzvekción jelenség okának és hatásmechanizmusának feltárását tűztük ki.

*Az értekezés formai követelményei miatt a továbbiak könnyebb megértését elősegítő tudományos háttéranyag a **Függelékben** található.*

1.2. Irodalmi áttekintés

1.2.1. A szomatikus párosodás és a transzvekciónak története

Metz (1916) leírta, hogy a mitózis során a *Drosophilák* és más *Dipterák* testi sejtjeiben a homológ kromoszómák - a meiózis profázisához hasonlóan - teljes hosszukban párosodnak egymással. A mitózis korai profázisában a homológok szorosan összetapadnak; ez a kapcsolat a metafázisban fellazul, de az anafázis végére ismét megerősödik. Mivel sejtosztódás előtt és után is látható a párosodás, *Metz* feltételezte, hogy ez az állapot fennmarad az interfázisban is. Ezt az elképzelést igazolta a lárvális politén, interfázisos óriáskromoszómák felfedezése (*Painter*, 1933), amelyeknél jól megfigyelhető a homológok párosodása. Az ezután beindult, széleskörű citológiai vizsgálatok során kiderült, hogy a párosodás megszűnik a kromoszóma egyes szakaszain, ha az egyik homológon szerkezeti átrendeződések (kromoszóma-mutációk) találhatók. Ezzel egyidőben felismerték, hogy egyes mutációk okozta fenotípus függ a homológ kromoszómák szomatikus párosodásától. Ezt a jelenséget **transzvekciónak** nevezte el *Lewis* (1954). A teljességre való törekvés igénye nélkül, az alábbiakban azokat a fontosabb géneket illetve mutációikat említem meg, melyeknél megfigyelhető ez a jelenség.

1.2.1.1. A *cubitus-interruptus* (*ci*) gén

A homológ kromoszómák párosodásától függő és fenotípusos következményekkel járó első adatok *Dubinyin* nevéhez fűződnek. Az általa megfigyelt ún. *cubitus-interruptus* hatás egy jól alkalmazható eszköznek bizonyult a negyedik és más, nem homológ kromoszómát egyszerre érintő átrendeződések, reciprok transzlokációk azonosítására. A *cubitus-interruptus* (*ci*) gén a negyedik kromoszómán található, melynek homozigóta mutáns alléljei a szárny hiányos vénázatát okozzák. *Dubinyin* (1934) felfedezte, hogy ezek a heterozigóta állapotban recesszív mutációk dominánssá válnak, ha a homológ kromoszómán, ami a vad allélt hordozza, bizonyos típusú átrendeződéseket - transzlokációkat - indukál. Ezek az átrendeződések nem érintik a vad allélt, és olyan más (ún. „second site”) mutációkat sem okoznak, amik befolyásolhatnák a *ci*⁺ gén működését. Ezt az a tény bizonyítja, hogy az átrendeződéseket hordozó kromoszómák sem homo-, sem hemizigóta (haploid) állapotban nem okoznak *ci* fenotípust, továbbá akkor is kifejtik hatásukat, ha nem a vad, hanem a mutáns allélt hordozó kromoszómán vannak. Vagyis:

$ci \cdot ci^+$	vad fenotípusú	
$ci \cdot R(ci^+)$	<i>ci</i> fenotípusú	
$R(ci^+) R(ci^+)$	vad fenotípusú	
$R(ci^+) 0$	vad fenotípusú	
$ci^+ R(ci^-)$	<i>ci</i> fenotípusú	(<i>R</i> a kromoszómális átrendeződést jelöli)

A *ci*-hatás tehát a homológ kromoszómák párosodásától függő, transzvekción jelenség. Ezt igazolja az a megfigyelés is, miszerint a recesszív *ci* mutáció szintén dominánssá válhat különböző *Drosophila* fajok közötti hibridekben: például a *D. melanogaster* / *D. simulans* *ci*⁺ genotípusú hibrid *ci* fenotípusú (Uphoff, 1949). Lemeunier és Ashburner (1984) kimutatták, hogy e hibridekben a negyedik kromoszómák gyengén párosodnak, hasonló módon, mint ahogy az a Dubinyin által izolált kromoszómális átrendeződések következtében megfigyelhető a *ci* lókuszkörnyezetében. Dubinyin (1934) továbbá megállapította, hogy a *ci*-hatással bíró átrendeződések negyedik kromoszómát érintő töréspontja mindig a *ci* lókuszhoz képest proximálisan (a centromer felé) található. Úgy tűnik tehát, hogy a homológok párosodása elsősorban a gén és a centromer közötti kromoszóma-szakasz folytonosságától függ. A *ci*-hatás pontos hatásmechanizmusa ma sem ismert.

1.2.1.2. A *brown* (*bw*) gén

A *bw* gén funkcióvesztéssel mutációjai recesszív fenotípusúak, csak a homozigóta egyedek mutatják a jellegzetes barna szemszínt. Korán ismertté váltak azonban domináns (*bw*^D), variegáló fenotípust okozó allélok is, melyeket kivétel nélkül kromoszómális átrendeződések - heterokromatikus töréspontot hordozó inverziók (Müller, 1930) vagy heterokromatikus kromoszóma-szakaszok inszerciói (Slatis, 1955a,b) - okoznak. Ez a domináns pozíció-effektus szintén a homológ kromoszómák párosodásától függ: *D. melanogaster*/ *D. simulans* *bw*^D/⁺ genotípusú

hibridekben ugyanis (lásd 16. oldal) nem észlelhető (*Morgan és mtsai.*, 1937). A későbbi vizsgálatok (*Henikoff és Dreesen*, 1989) felderítették, hogy a vad allélt hordozó homológon indukált, a *bw* génhez közeli töréspontú, de a gént érintetlenül hagyó átrendeződések is megszüntetik illetve csökkentik ezt a párosodás-függő, domináns inaktivációt. Az inaktiváció okát is sikerült megfejteni: találtak a *bw* génben egy olyan szakaszt, melyet eltávolítva párosodás esetén sem inaktiválódik (illetve csak igen kismértékben) a transz helyzetű *bw*⁺ gén (*Dreesen és mtsai.*, 1991). Ez a szakasz köti azon heterokromatikus fehérjéket, melyek a jelenséget kiváltó inverzió illetve transzpozíció révén kerülnek a *bw* gén közvetlen szomszédságába.

1.2.1.3. A *bithorax* (*bx*) lókuszt és *E. Lewis*

Lewis 1954-ben érdekes megfigyelést írt le: ha az egyik harmadik kromoszóma a *bx*³⁴, míg a másik az *Ubx*¹ mutációt hordozza, az így látható mutáns fenotípus (a billér részlegesen szárnyá alakul) egyes esetekben megerősödik, ha az egyik harmadik kromoszómán egy átrendeződés található. Vagyis:

$$bx^{34} / Ubx^1 < R(bx^{34}) / Ubx^1 \text{ illetve } bx^{34} / Ubx^1 < bx^{34} / R(Ubx^1)$$

és

$$R(bx^{34}) / Ubx^1 = bx^{34} / R(Ubx^1)$$

(< : erősebb mutáns fenotípus, *R* : kromoszómális átrendeződés)

Lewis a jelenséget „*transzvekciónak*” nevezte el, amit így definiált: „pozíció effektus, amely kromoszómális átrendeződések következtében nyilvánul meg a transz-heterozigótákban”. Noha *Lewis* kezdetben úgy gondolta, hogy különböző gének mutációinak a hatását látja, az általa leírt törvényszerűségek kiválóan alkalmazhatók ma is. Ezek a következők:

1. szabály: Azon átrendeződéseknek, melyek a fenti esetben a fenotípus szigorodását okozzák, az egyik töréspontjuk a harmadik kromoszóma centromerje és a *bx* lókuszt közötti szakaszon (a 81A-tól a 89E-ig terjedő citológiai egységen, az ún. „kritikus régió”) belüli, míg a másik töréspontjuk ezen kívüli területre esik.
2. szabály: Azoknak az átrendeződéseknek, melyeket valamely más, független módszerrel találnak, de a fenti tesztben nem fokozzák a mutáns fenotípust, mindkét töréspontjuk a kritikus régió kívül található.
3. szabály: Ha az egyik töréspont a kritikus régió proximális részére (81-86 régió belül) esik, akkor a másik töréspont az X, 2L, 2R és 3R kromoszóma-karokon disztális helyzetű.
4. szabály: Ha az egyik töréspont a kritikus régió (81A-89E) disztális részén van, akkor a másik töréspont eloszlása teljesen véletlenszerű.

Lewis (1954) továbbá megállapította, hogy a mutáns fenotípus még tovább erősíthető, ha mindkét kromoszómán olyan átrendeződés van, amely külön-külön is ilyen hatással bír. Ha azonban a két átrendeződés nagyon hasonló - közeli -, esetleg azonos törésponttal rendelkeznek, akkor nem gyengül a homológok párosodása és ezáltal nem erősödik a fenotípus. Ez utóbbi megállapítást az ötödik szabályként szokták említeni. (Természetesen, mint minden szabály alól, ritkán itt is előfordulnak kivételek.) *Lewis* munkássága jelentős hatást gyakorolt a későbbi transzvekción vizsgálataira és számtalan más eredmény köszönhető neki. Módszerét követve például igen könnyen lehet átrendeződéseket izolálni a harmadik kromoszóma jobb karján, a kritikus régió belül.

1.2.1.4. A *Contrabithorax* (*Cbx*) mutációk

A domináns *Cbx* mutációk hatására a második torszelvény (T2) részlegesen harmadik torszelvénnyé (T3) alakul, aminek legszembeűnőbb jele a szárny részleges billérré való módosulása. E homeotikus transzformáció annak a következménye, hogy az *Ubx* gén ektopikusan aktiválódik a T2-ben (az *Ubx* ugyanis normálisan csak a hátrébb elhelyezkedő szelvényekben fejeződik ki).

A *Cbx*¹ mutációt (*Lewis*, 1954) az *Ubx* gén egyik cisz-regulátorának (*pbx*) az *Ubx*-doménon belüli transzpozíciója okozza (*Bender* és *mtsai.*, 1983; *Casanova* és *mtsai.*, 1985; *Karch* és *mtsai.*, 1985). Érdekes módon a *Cbx*¹/*Ubx*¹ transz-heterozigóták kevésbé *Cbx* fenotípusúak, mint a *Cbx*¹/+ heterozigóták. Ez a

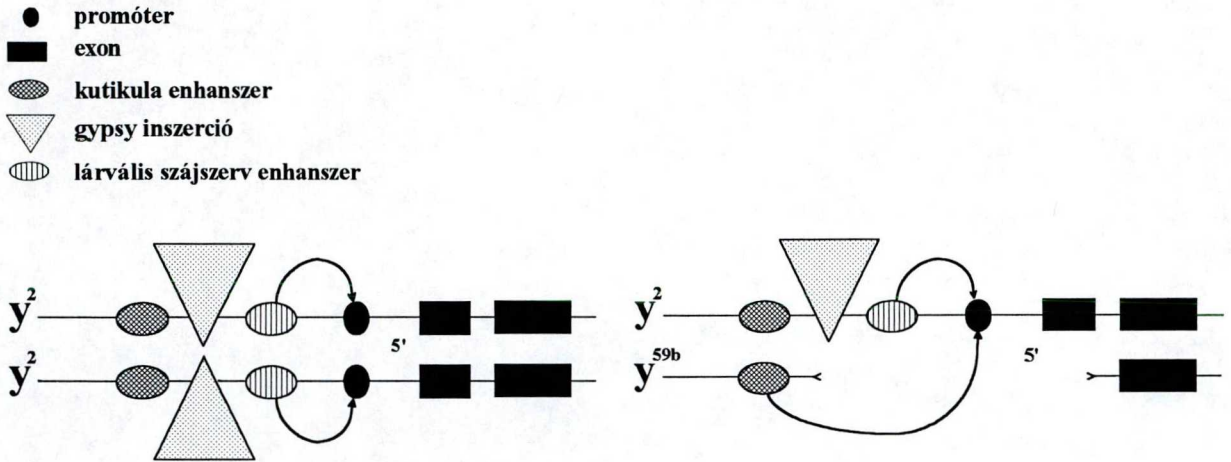
megfigyelés arra utal, hogy a Cbx^1 mutáció következtében mindkét homológon megváltozik az Ubx gén működése, vagyis a Cbx^1 mutáció mind cisz-, mind transz-hatással bír. A transz-hatást igazolja az a tény is, miszerint egy cisz-helyzetű Ubx mutáció nem szünteti meg teljesen a mutáns fenotípust: a $Cbx^1Ubx^1/+$ kettős (cisz-) heterozigóták - noha sokkal gyengébb mértékben, mint a $Cbx^1/+$ heterozigóták - továbbra is Cbx fenotípusúak maradnak, ami kizárólag a vad homológ kromoszómán lévő ép Ubx gén transz-regulációjával magyarázható (az Ubx^1 ugyanis egy null mutáció). A $Cbx^1Ubx^1/+$ cisz-heterozigóták gyenge Cbx fenotípusa szigorúan párosodás-függő: megszűnik vagy visszaszorul, ha a kritikus régióban, bármelyik harmadik kromoszómán átrendeződést indukálunk.

A Cbx^2 mutációt (Lewis, 1982) egy inverzió okozza, melynek egyik töréspontja az Ubx gén pbx cisz-regulátor régiójában van (Bender és mtsai., 1985), míg a másik töréspont a *bithorax-komplex*-en kívül, a 91C-E citológiai régióban található (Lewis, 1982). A Cbx^2 mutáció a Cbx^1 -hez hasonlóan párosodás-függő, domináns Cbx fenotípust okoz, de itt a mutáns jelleget csak a párosodás gátlása esetén láthatjuk (Micol és Garcia-Bellido, 1988). Ha a két eltérő Cbx mutáció hatását összehasonlítjuk, akkor azt mondhatjuk, hogy a Cbx^1 esetében az ektopikusan aktív, mutáns gén aktiválja az inaktív, vad típusú gént, míg a Cbx^2 esetében a vad, inaktív gén inaktiválja a mutáns, ektopikusan aktív gént. A homológ kromoszómák párosodása tehát mind aktiváló, mind inaktiváló hatást közvetíthet, egyazon gén esetében is.

1.2.1.5. A *yellow* (*y*) gén

A recesszív, y^{59b} null mutációra homozigóta felnőtt muslicák és lárvák egyaránt mutáns fenotípusúak: például a normálisan szürkés-barna adult kültakaró sárga, illetve a normálisan fekete lárvális szájszerv sárgás-barna színű. Ettől eltérően, a y^2 allél esetében csak a homozigóta felnőtt egyedek kültakarója mutáns (sárga színű), a lárvális szájszerv viszont vad (fekete) színezetű. A várakozással ellentétben, a y^2/y^{59b} transz-heterozigóta lárvák és felnőtt egyedek egész testükön vad fenotípusúak (Geyer és *mtsai.*,1990). Ez az interallélikus komplementáció megszüntethető, ha kromoszómális átrendeződésekkel gátoljuk a mutációkat hordozó homológok párosodását. A y^2/y^{59b} transz-heterozigótákban észlelt transzvektációs jelenség megértését a két különböző *yellow* allél molekuláris szintű megismerése tette lehetővé. A y^2 allélban egy genetikai mozgékony elem, ún. „gypsy” retro-transzpozon ékelődött a *yellow* gén szövetspecifikus enhanszerei közé, ezáltal egyes enhanszereket elválaszt a *yellow* gén promóter régiójától. A y^{59b} az előző allél származéka, egy deléciót hordoz, ami eltávolítja az inszerciót, sőt a *yellow* gén promóterét és az első exont is. A deléció ugyanakkor érintetlenül hagyja azokat az enhanszereket, amelyek a y^2 allélban az inszerció másik oldalán, a *yellow* géntől távolabbi irányba esnek (22. oldal, 1. ábra). A y^2/y^{59b} transz-heterozigótákban a y^{59b} kromoszómán maradó ép enhanszerek képesek kölcsönhatásba lépni a y^2 kromoszómán lévő ép promóterrel (22. oldal, 1. ábra). Az így létrejövő ún. „transz-regulációnak” köszönhető a kapott interallélikus komplementáció.

1. ábra. A *yellow* gén szabályozása y^2/y^2 homozigótában és y^2/y^{59b} transz-heterozigótában (egyszerűsített rajz).



1.2.1.6. A *zeste-white* (*z-w*) kölcsönhatás

Gans (1949) leírt egy érdekes, a *D. melanogaster* X kromoszómájára térképezhető mutációt, amit *zeste*-nek (*z*) nevezett el jellegzetes citromsárga szemszíne miatt. A mutáció eltérő fenotípust eredményezett a két nemből: az $X^{z1}Y$ hímek vad (piros), míg az $X^{z1}X^z$ nőstények *zeste* (sárga) szeműek voltak. *Gans* 1953-ban kimutatta, hogy két vad kópia kell a szintén X-kromoszómán lévő *white* (*w*) génből ahhoz, hogy láthassuk a jellegzetes szemszínt. Ez azonban csak szükséges, de nem elégséges feltétel: ha az egyik w^+ gén közvetlen környezetében (a 3C citológiai régió belül) a gén elrontása nélkül kromoszómális átrendeződést indukálunk, illetve eredeti helyéről egy transzpozíció révén egy másik kromoszómális környezetbe juttatjuk a w^+ gént, megszűnik a mutáns fenotípus. Hasonló módon, egy hemizigóta *z* hímnek vad típusú marad a szemszíne, ha az

egyik autoszómáján egy extra kópia w^+ gént hordoz. Ha azonban erre az inszercióra homozigótává válik (az X kromoszómán pedig w^- lesz), akkor az ilyen hímnek (a homozigóta z nőstényekhez hasonlóan) citromsárga lesz a szeme. Mindebből kitűnik, hogy a két kópia w^+ génnek párosodnia is kell. A *zeste-white* kölcsönhatás szempontjából fontos geno- és fenotípusok az 1. táblázatban találhatóak.

1. táblázat

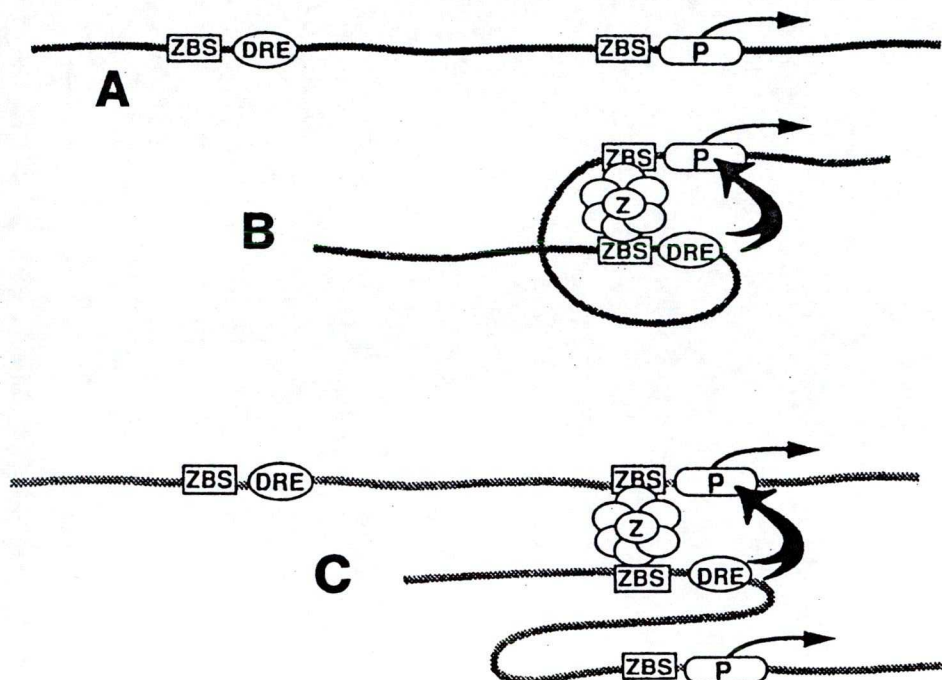
Genotípus:	Fenotípus:
z^1w^+/Y	piros szem
z^1w^+/z^1w^+	sárga szem
$z^1Dp(1;1)w^+/Y$	sárga szem
z^1w^+/z^1w^-	piros szem
$z^1w^+/Y;Dp(1;A)w^+/+$	piros szem
$z^1w^-/Y;Dp(1;A)w^+/+$	piros szem
$z^1w^+/Y;Dp(1;A)w_i^+/Dp(1;A)w_i^+$	piros szem
$z^1w^-/Y;Dp(1;A)w_i^+/Dp(1;A)w_i^+$	sárga szem
$z^1Dp(1;1)w^+/Y;Dp(1;A)w^+/+$	piros szem
$z^1Dp(1;1)w^+/Y;Dp(1;A)w_i^+/Dp(1;A)w_i^+$	sárga szem
$z^1w^-/Y;Dp(1;A)w^+w^+/+$	sárga szem
$z^1w^-/Y;Dp(1;A)w^+w^+/Dp(1;A)w_j^+$	piros szem
$z^1w^-/Y;Dp(1;A)w_i^+/Dp(1;A)w_j^+$	piros szem

$Dp(1;1)w^+$ egy tandem-duplikációja a w^+ génnek a 3C régióban az X kromoszómán. (A tandem-duplikáción belül az azonos kromoszóma-szakaszok párosodnak egymással). $Dp(1;A)w^+$ a w^+ gén transzpozíciója az X-ről egy autoszómára. $Dp(1;A)w_i^+$ és $Dp(1;A)w_j^+$ két különböző autoszómás transzpozíció. $Dp(1;A)w^+w^+$ autoszómás tandem duplikációja a w^+ génnek. A z^1w^-/Y genotípusú hímeknél leírt összes geno- és fenotípus alkalmazható a z^1w^-/z^1w^- genotípusú nőstényekre is (Ashburner nyomán, 1989a).

1.2.1.7. A *zeste* (*z*) gén szerepe a transzvekciónban

Lewis (1954) eredeti kísérletében, melyben a párosodást befolyásoló átrendeződéseket izolálta, talált egy recesszív, X kromoszómára lokalizálható mutációt, ami a kromoszómális átrendeződésekhez hasonlóan, szintén gyengítette az interallélikus komplementációt. Ezt a mutációt *Lewis* „*enhancer of bx*”-nek (rövidítve *e(bx)*-nek) nevezte el. Később kiderült, hogy az *e(bx)* egy *zeste* allél (*Kaufman* és *mtsai.*, 1973). A további kutatások feltárták, hogy számos esetben egyes *z* allélok (az ún. z^a allélok, a z^l allél funkció-vesztésés származékai, illetve az *e(bx)* allél) hatnak más, transzvekción mutató rendszerekre is. Például: a $Cbx^l Ubx^l+$ heterozigóták *Cbx* fenotípusa megszűnik (*Gelbart* és *Wu*, 1982), míg a $Cbx^{2l}+$ egyedeknél épp ellentétesen, láthatóvá válik a mutáns jelleg z^a allélok jelenlétében (*Micol* és *Garcia-Bellido*, 1988). Más esetekben *z* háttéren megszűnik a párosodás függő, interallélikus komplementáció (y^2/y^{59b} , *Geyer* és *mtsai.*, 1990). Mindezen adatok a *zeste* gén intenzív genetikai és molekuláris vizsgálatára irányították a figyelmet. A ZESTE fehérjéről kiderült, hogy DNS-kötő tulajdonságú és multipolipeptid aggregátumokat képez (*Benson* és *Pirotta*, 1987, 1988). A ZESTE fehérje kooperatív módon kötődik a DNS-hez, és olyan kromoszómális régiók összekapcsolására is képes, melyek egymástól egyébként távol, esetleg különböző homológokon helyezkednek el (*Wu* és *Goldberg*, 1989, lásd következő oldal, 2. ábra.)

2. ábra. A zeste gén szerepe a nagytávolságú génszabályozásban az ún. „looping-modell” révén. DRE=távoli regulátor elem, P=promóter, ZBS=zeste-kötő DNS-szakasz, Z=ZESTE fehérjekomplex, A=lineáris állapot, B=kihurkolódás, cisz-reguláció, C=kihurkolódás, transz-reguláció (transzvekción). A folytonos vonal a homológ kromoszómákat jelképezi (Pirota, 1991).



Ez az eredmény csak tovább fokozta a *zeste* gén iránti érdeklődést. Kiderült azonban, hogy a *z* nem minden transzvekción rendszerre hat, például a bw^D esetében nincs hatása. Így megdőlt az a feltevés, miszerint a ZESTE fehérje elsődleges és általános szerepe a homológ kromoszómák összetartása lehet. E mellett azt is megállapították, hogy a ZESTE fehérje in vitro DNS-kötésre csak akkor képes, ha két kötőhely található egymás mellett. A „kegyelemdőfészt” az jelentette, amikor *Goldberg* és munkatársai (1989) átfedő deléciók révén kimutatták, hogy a *zeste* gén nem életfontosságú. Viszont egy sor fontos és új dologra derült fény a *z* gén vizsgálata során: a ZESTE fehérje a *y*, az *Ubx* és a *w* gén transzkripció faktor.

A z gén fontossága leginkább „szembetűnő” az utóbbi esetben: ha a normális WHITE fehérjének legalább 3 százaléka jelen van a muslica szemében, akkor az vad fenotípust eredményez. Ezzel szemben világosabb, barnás színű egy *zeste* null allélra homo- vagy hemizigóta muslica szeme, ami annak a következménye, hogy működőképes *zeste* géntermék hiányában a WHITE fehérje mennyisége lecsökken a kritikus szint alá. Semmilyen más fenotipikus jelleg nem figyelhető meg *zeste* null, de egyébként vad genetikai háttéren. Érdeemes újból visszatérni a z^1 allél okozta szemszínre: a sárga szín (egy z null allél okozta barnához képest) a w^+ géntermék további csökkenésének a következménye, vagyis a z^1 allél antimorf. Ezt igazolja revertálhatósága és az így kapott barnás szemszín. A z^1 mutáció okozta sárga szemszín szuppresszálható is: ha hiányzik a *Posterior sex combs* (*Psc*, Jürgens, 1985), a *Suppressor 2 of zeste* (*Su(z)2*, Kalisch és Rasmuson, 1974), vagy a *Sex combs on midleg* (*Scm*, Jürgens, 1985) gének terméke, akkor visszaáll a vad szemszín. Mindhárom gén a *Polycomb* (*Pc*) csoport tagja, melynek fontos szerepe a kromatin inaktív konformációs állapotának fenntartása (Jürgens, 1985, Paro, 1990). Úgy tűnik tehát, hogy a z^1 allél olyan fehérjét termel, mely kötődve a w génhez odavonz olyan más fehérjéket, melyek inaktiválják a w gént. Ezt a feltevést igazolni látszik az az adat, miszerint z^+ (vad) háttéren a PSC fehérje nem kötődik a w lokuszhoz a nyálmirigy-óriáskromoszóma készítményeken (Rastelli és mtsai., 1993). Ugyanakkor enhanszere is létezik a z^1 mutációnak: mint ismeretes, a z^1/Y hemizigóta hímek vad szeműek, csak a z^1/z^1 homozigóta nőstények szeme sárga. Egy másik

Pc-csoportba tartozó gén - az *Enhancer of zeste* ($E(z)$, Kalisch és Rasmuson, 1974) - funkció-nyeréssel mutációja dominánssá teszi a z^1 mutációt hívekben. A funkció-vesztéssel $E(z)$ allélok viszont z^1 szuppresszorként viselkednek (Jones és Gelbart, 1990).

1.2.1.8. A szomatikus párosodás és a transzvekciónak előfordulása más élőlényekben

Joggal merül fel a kérdés, hogy ez a két jelenség vajon előfordul-e a muslicán kívül, más szervezetben is. Mint az eddigiekből kiderült, a transzvekciónak előfeltétele a homológ kromoszómák párosodása a testi sejtekben. Ez a mitózis során normálisan csak a *Dipteráknál* figyelhető meg. Az interfázisos kromoszómák viszont csak politén állapotban tanulmányozhatók. Ilyen állapot csak ritkán fordul elő az élővilágban, ott, ahol hirtelen nagy mennyiségű géntermékre lesz szükség. Így van ez a növényvilágban például a *közönséges bab* (*Phaseolus vulgaris*) sziklelevelének ún. „szuszpenzor sejtjeiben” (Nagl, 1969). Itt viszont a homológok nem párosodnak. Az eddigi módszerektől eltérő, más eljárásokra van tehát szükség az interfázisos kromoszómák párosodásának széleskörű vizsgálatára.

A kérdés gondolati szinten is elemezhető. Minden élőlény mindegyik génje „ismeri és gyakorolja” is a párosodást, sejtciklusonként legalább egy alkalommal. Ez a replikációs villán való áthaladáskor történik, amikor a testvér-kromatidák közel vannak egymáshoz és „információt is cserélnek” (Wu, 1993). Noha ez nem a

homológ kromoszómák, hanem a testvér-kromatidák párosodása, elképzelhető, hogy a replikációs villában résztvevő egyes faktorok „másodállásban” szerepet játszanak a homológok párosodásában is. Egyes szerzők szerint ez egy lehetséges tényező a replikációs kontroll folyamatában (Roberts és Weintraub, 1986; Abeles és Austin, 1991; Kittel és Helinski, 1991).

Természetesen igazi jelentőséggel a kísérleti adatok bírnak. A mitotikus rekombináció nem működhetne a homológok párosodása nélkül. Ez egyes esetekben látható is: German (1974) leírta, hogy a Bloom-szindrómában szenvedő emberekben az abnormális metafázisok több, mint nyolcvan százalékában egy „quadriradiális figura” figyelhető meg azonos hosszúságú kromoszóma-szakaszok kicserélődése miatt. Arnoldus és munkatársai (1989) szintén közvetlen adatokkal szolgáltak: az 1. és 7. emberi kromoszómák centromer-specifikus próbáival *in situ* hibridizációt végeztek interfázisos sejtekben. A 7. kromoszóma próbájával két különálló jelet kaptak a kisagyi és nagyagyi szövetekben egyaránt. Ezzel szemben, az 1. kromoszóma próbájával a kisagyi sejtekben csak egy nagy, összefüggő jelet láttak. Ezek szerint az emlős sejtekben a homológok szomatikus párosodása nemcsak a kérdéses kromoszóma-szakasztól, hanem az adott sejtípustól is függ.

Látható tehát, hogy a homológok párosodása nem kizárólag a *Drosophila* sajátja. De vajon van-e példa a transzvekciónak a jelenségére is más élőlényekben? Úgy tűnik, igen. A növényvilágban Bollmann és munkatársai (1991) szerint az oroszországi (Antirrhinum) mutáns nivea alléljának szemidominanciája, illetve az állatvilágban az egér anyai hatású, T génje (Tsai és Silver, 1992) esetében

tapasztalható interallélikus kölcsönhatás szintén transzvekción alapszik. *Laird* (1990) hasonlóságot vélt felfedezni az emberi *Huntington*-szindróma és a domináns pozíció-effektus-variegáció, a párosodás közvetítette transz-inaktiváció között (muslicában a bw^D esete). *Bitter* és munkatársai (1985) akut nonlimfocitás leukémiában szenvedők sejtjeiben olyan inverziókat, transzlokációkat vagy transzpozíciókat találtak, amik egyszerre érintették a 3q21 és 3q26 ún. „törékeny régiókat”. *Le Beau* és munkatársai (1983) akut myelomonocitás leukémiások 16-os kromoszómáján a p13 és q22 régiókat együtt érintő átrendeződéseket észleltek. Lehet, hogy ezen töréspontok okozta mutációk felelősek a betegségek kialakulásáért. Az is elképzelhető viszont, hogy vannak olyan gének, melyek részt vesznek a sejtosztódás szabályozásában, és a normális működésükhöz szükség van a homológ kromoszómák párosodására. Ez azonban gátolt az átrendeződések következtében, ami hibás működéshez (betegséghez) vezet (*Tartof* és *Henikoff*, 1991).

1.2.2. Mikor jön létre a transzvekción?

A transzvekcións jelenségek vizsgálata során a két legfontosabb, egymással szorosan összefüggő feladat annak a tisztázása, hogy a homológ kromoszómák párosodása mikor és milyen mechanizmus révén fejt ki hatását a génműködésre. A legtöbb magyarázat (lásd következő fejezet) szerint a transzvekción azon alapszik, hogy a homológok párosodnak a transzkripción során.

Ettől eltérően, a „nukleáris kompartmentalizáció” (*Zachar és mtsai.*, 1985, *Carter és mtsai.*, 1991, *Leonhardt és mtsai.*, 1992) és a transzkriptumok ún. „nukleáris ösvényekben” (*Xing és Lawrence*, 1991) történő lokalizációja révén lehetőség van arra, hogy a transzvekciónak a transzkripció után következzen be, például a képződött és az „érés” során feldarabolt RNS-molekulák egyes darabjainak „kereszt-illesztése” (ún. „trans-splicing”, *Judd* 1979) által.

Egy másik lehetőség szerint, ha a transzkriptumok csoportot (ún. „cluster”-t) alkotnak a sejtmagban, akkor csoportosulva lépnek majd be a citoplazmába is, ahol a transláció során keletkező fehérje koncentrációja lokálisan magas értékű lesz. Ha az így keletkezett géntermék hatása koncentráció-függő, akkor a homológok párosodásának hatása csak a transláció után nyilvánul meg (*Xing és Lawrence*, 1991).

A transzvekciónak szempontjából kritikus párosodás a transzkripció előtt, a replikáció során is létrejöhet, de következménye a párosodás megszűnte után, sejtciklusokon át is megmaradhat, ha a párosodott-nem párosodott állapotukra „emlékeznek” az egyes gének (ún. „imprinting”, *Sabl és Laird*, 1992).

1.2.3. A homológok párosodásának szerepe, a transzvekciónak jelentősége

Vajon az egyedfejlődés első pillanatától, a diploid állapot kialakulásától kezdődően párosodnak a *Dipterák* homológ kromoszómái? Ha nem, akkor mikor következik be ez a jelenség? A kérdés megválaszolásához szükséges első adatokat genetikai kísérletek szolgáltatták. *Martinez-Laborda* és munkatársai (1992)

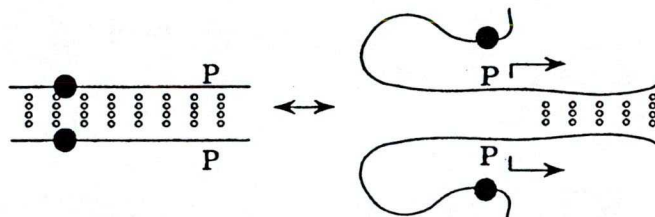
kimutatták, hogy a *yellow* gén transzvekciónak (1.2.1.5. fejezet) hasonló transz-reguláció jön létre az *Ubx* doménben is, ha az egyik homológ az *Ubx* gén promótere, míg a másik homológ az *Ubx* gén egyik cisz-regulátora (enhanszere) hiányzik illetve hibás. Ilyen mutáns-kombinációban párosodás esetén igen erős komplementáció észlelhető az *Ubx* gén által meghatározott két paraszegment (a PS5 és PS6) nagy részén. Érdekes módon a PS5 anteriorális felén (PS5a) nincs komplementáció. Ugyanakkor kimutatható, hogy a második láb-diszkuszban (mely a PS5 anteriorális részén helyezkedik el) SEX COMBS REDUCED fehérje (SCR) jelenik meg, ami vad típusú állatokban nem észlelhető. Az UBX fehérjéről tudott, hogy gátolja a *Scr* gén működését (Struhl, 1982). Amennyiben az UBX fehérje hiányzik az egyedfejlődés első tíz órája során, a későbbi jelenléte már nem tudja meggátolni a *Scr* gén ektopikus kifejeződését. Martinez-Laborda és munkatársai (1992) ezek alapján feltételezték, hogy az *Ubx* gén környezete az egyedfejlődés első óráiban még nem párosodott.

Az előbbi feltevés helyességét Hiraoka és munkatársai (1993) igazolták. *In situ* hibridizáció révén kimutatták, hogy a homológ kromoszómákon lévő hiszton géncsoport az egyedfejlődés első két órájában nem párosodik (ez az egyrétegű, szinciciális blasztoderma állapot, a tizenharmadik osztódási ciklus). A tizennegyedik ciklusban bekövetkezik a cellularizáció, kialakulnak a sejthártyák a sejtmagok körül. Ettől az osztódási ciklustól kezdve a vizsgált kromoszóma-szakasz párosodva figyelhető meg, melynek egyúttal megváltozik a sejtmagon belüli térbeli helyzete is: a központi részről elmozdulva, apikálisan helyezkedik el (ez a helyváltoztatás

feltehetőleg a centromer környezetében elhelyezkedő heterokromatin kondenzációjával magyarázható). Valószínű, hogy a párosodás időpontja nem a véletlen műve: ebben a ciklusban (14.) aktiválódik a zigótikus gének zöme.

Ezen előzmények alapján *Wu* (1993) felvetette annak a lehetőségét, hogy a homológok párosodásának szerepe lehet a génműködés szabályozásában. Modelljében egy adott kromoszóma-szakasz a „lineárisan rögzített” állapotban szorosan párosodik a homológjával. Ebben a helyzetben az adott területen lévő gén enhanszere nem juthat a promóter közelségébe, mert mindkét régió a saját homológjával párosodik, mintegy odaszegecselve. A „kihurkolódott” állapotban lokálisan megszűnik a párosodás, a promóter és az enhanszer régiók kellő közelségbe kerülhetnek (3. ábra), mely által lehetővé válik a transzkripció.

3. ábra. A kromoszóma „lineárisan rögzített” és „kihurkolódott” állapota (*Wu*, 1993). ●=enhanszer, P=promóter. A párosodott kromoszóma-szakaszt a kis üres karikák (o) jelképezik.



A homológ kromoszómák párosodásának szerepéről és a transzvekciónak jelentőségéről alkotott vélemények igen eltérőek. Az előbbieken alapján, *Wu* (1993) szerint a párosodás egyik feladata az lehet, hogy kizárja a transzvekciónak ott, ahol az káros lenne (például nem adekvát promóterek és enhanszerek kölcsönhatása során). Ezzel ellentétben, egyes esetekben a transzvekciónak „túlélési esély, mentőöv”

lehet a létrejövő komplementáció révén (*Zachar és mtsai.*, 1985; *Monk*, 1990). *Ashburner* (1977) szerint a transzvekción alapvető, kulcsfontosságú folyamat lehet politén sejtekben. Ugyanakkor az is elképzelhető, hogy a transzvekción nem egy speciális feladat ellátására kifejlesztett biológiai képesség, hanem azért létezik, mert olyan faktorokat „használ”, amelyek elsődleges szerepe más, alapvető biológiai folyamatokban való részvétel, a transzvekción pedig csak melléktermék (*Wu*, 1993).

Kétségtelenül igaz, hogy transzvekción kimutatni eddig csak akkor sikerült, ha legalább az egyik homológ kromoszóma mutáns allélt hordozott. Homozigóta vad allélok esetében látszólag semmilyen következménye nincs annak, ha a homológok nem párosodnak. Előfordulhat azonban, hogy az egyes fenotípusos jellegek nem reagálnak elég érzékenyen a párosodás hiányában bekövetkező finom génműködésbeli változásokra. Ezt sugallja *Goldsborough* és *Kornberg* eredménye (1996), akik molekuláris módszerrel kimutatták, hogy lecsökken az *Ubx* gén kifejeződésének mértéke mindkét homológon, ha a homológ kromoszómák párosodása átrendeződések következtében meggyengül.

Véleményem szerint a transzvekción legnagyobb tudományos jelentősége (attól függetlenül, hogy létezik-e vad típusú genetikai háttéren is, vagy nem) az, hogy vizsgálata során számos biológiai folyamat részleteit megismerhetjük. Ennek szemléltetésére, e fejezet végezetéül következzen egy felsorolás, ami az eddig ismert esetekben a transzvekción lehetséges mechanizmusait írja le, mintegy ötletet adván egy-egy biokémiai vagy genetikailag tanulmányozott jelenség részleteinek megértéséhez és megismeréséhez.

- 1., Az RNS-polimeráz templát-váltása az egyik homológól a másikra (*Babu és Bhat, 1980*)
- 2., Az RNS-molekula egyes részeinek kereszt-kapcsolása az RNS „érése” során (ún. „trans-splicing” , *Judd, 1979*)
- 3., Intracisztronos mitotikus rekombináció (*Lawrence és Green, 1979*)
- 4., A kromatin-szerkezet oldalirányú „tovaterjedése” (*Ashburner, 1977; Babu és mtsai., 1987; Henikoff és Dreesen, 1989*)
- 5., A gének - transzkripció miatti - elhelyezkedése speciális nukleáris kompartmentekbe (*Zachar és mtsai., 1985*)
- 6., A DNS molekula kihurkolódása (ún. „looping”), melynek során az enhanszerekhez kötött transzkripciós aktivátor faktorok kölcsönhatásba lépnek a másik homológon lévő gén promóter régiójával (*Pirotta és mtsai., 1985; Biggin és mtsai., 1988; Benson és Pirotta, 1988; Mansukhani és mtsai., 1988*)
- 7., Az egyik gén által termelt regulátor molekulák átjutása lokális diffúzió révén a párosodott homológ gén promóterére (*Lewis, 1954; Jack és Judd, 1979; Micol és Garcia-Bellido, 1988*)

2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

2.1. *Drosophila* tenyészet és törzsek

A *Drosophila* törzsek fenntartásához standard muslica-táptalajt használtunk, amelyben kukoricaliszt, szárított élesztő, agar és cukor a főbb komponensek. Az alább nem említett egyéb törzsek leírását *Lindsley és Zimm (1992)* munkája tartalmazza. A kísérleteinkben használt fontosabb törzsek: *Abd-B^{D14}*, *Abd-B^{D16}* (*Karch és mtsai.*, 1985), *Abd-B^{RD18}*, *Df(3R)U110* (*Hopmann és mtsai.*, 1995), *Abd-B^{S1}*, *Abd-B^{S4}* (*Tiong és mtsai.*, 1985), *Abd-B^{R41}*, *Fab-7*, *In(3R)Fab-7R7*, *Df(3R)R59* (*Gyurkovics és mtsai.*, 1990), *iab-7¹⁶⁴* (*Celniker és mtsai.*, 1990) *iab-7^{Sz}* (*Galloni és mtsai.*, 1993), *Mcp^{B116}* (*Karch és mtsai.*, 1994), *UC21-10*, *UC21-10,1-d* (*McCall és mtsai.*, 1994)

2.2. Általános módszerek

A felnőtt állatokból a kutikula-preparátumokat *Duncan (1982)*, a lárvális nyálmirigy-óriáskromoszóma preparátumokat *Ashburner (1989b)* szerint készítettük el. A teljes genom-*Southern* analízist *Bender és mtsai. (1983)* módszerét követve végeztük el.

2.3. *Drosophila* embriók immun-hisztokémiai festése

A megfelelő genotípusú legyeket tizenhét órán át petéztették. Az így összegyűjtött petéket kétszeresére hígított háztartási hypóban két percig áztattuk, hogy eltávolítsuk a külső peteburkot, a choriont. A fixáló-pufferhez (0,1M PIPES, 2mM $MgSO_4$, 1mM EGTA, 0,03% NaN_3 , pH=6,9 NaOH vagy HCl oldattal beállítva) tized térfogatú 37%-os formaldehidet, majd a pufferrel azonos térfogatú n-heptánt adtunk. Az embriókat erőteljesen összeráztuk az így kapott fixáló eleggyel, majd forgókerékre téve tíz percen keresztül fixáltuk. Ezután eltávolítottuk az alsó, vizes fázist és a megmaradt, felső fázist azonos térfogatú $-20\text{ }^\circ\text{C}$ -os metanollal ismét erőteljesen összeráztuk az embriókat. Ekkor a belső peteburoktól (ún. vitellintől) is megfosztott embriók lesüllyedtek az elegy aljára. A folyadékot eltávolítottuk és hideg metanollal kétszer, majd 1xPBT-vel (1xPBT=1xPBS + 0,1% Triton X-100 + 0,1% BSA, 1xPBS = 137mM NaCl, 2,7mM KCl, 10,1mM Na_2HPO_4 , 1,8 mM KH_2PO_4 pH=7,5 NaOH vagy HCl oldattal beállítva) háromszor leöblítettük az embriókat. Ezután háromszor húsz percen át forgókeréken 1xPBT-ben rehidratáltuk az embriókat. Az elsődleges ellenanyagot (1A2E9 jelű, monoklonális egér-anti-ABD-B, *Celniker* és *mtsai.*, 1989) 1xPBT-vel kétszeresére hígítottuk és 4°C -on egy éjszakán át forgókerékre téve inkubáltuk benne az embriókat. Másnap az elsődleges ellenanyag eltávolítása után három öblítés és három húszperces mosás következett 1xPBT-vel. Ezután a másodlagos ellenanyaggal (torma-peroxidázzal konjugált nyúl-anti-egér Ig /DAKO/, 1:200 arányban hígított előhűtött ($4\text{ }^\circ\text{C}$) 1xPBT-vel) $4\text{ }^\circ\text{C}$ -on 3 és fél órán keresztül forgókeréken inkubáltuk az embriókat. (Ilyen körülmények között sikerült elérni



teljesen háttérmentes, de maximális intenzitású specifikus festődést.) A másodlagos ellenanyaggal történő inkubálás után 1xPBT-vel ismét 3 öblítés és 3 mosás (lásd előbb) következett. Ezután kétszer leöblítettük az embriókat festő-pufferrel (0,1M citromsav, 0,05M ammónium-acetát pH=5,7 NH₄OH oldattal beállítva). A festőelegyet 980 µl festő-puffer, 20 µl DAB-oldat (25 mg/ml törzsoldat, végső koncentráció 0,5 mg/ml, 0,1M TRIS-ben (pH=7,5) oldva), 2ml H₂O₂ (30% törzsoldat, végső koncentráció 0,06%) elegyítésével állítottuk elő. Mikroszkóp alatti ellenőrzés után, a megfelelő festési intenzitást elérve eltávolítottuk a festőelegyet és az embriókat hatszor egymás után 1xPBT-vel leöblítettük. Az embriókból a központi idegrendszer hasdúci nyúlványát glicerin-10xPBT 9:1 arányú keverékében mikroszkóp alatt wolfrámtűkkel kiboncoltuk.

2.4. Rekombinációval előállított kromoszómák

(A megnevezett kromoszómákon az egyes mutációk sorrendje mindig a proximális-disztális iránynak megfelelő.)

2.4.1. *Fab-7Abd-B*^{D16}

Ha egy *Abd-B* pontmutáció transz-helyzetben van a *Fab-7* mutációval (*Fab-7|Abd-B*), akkor a hím egyedek hatodik tergitje sokkal szélesebb, mint abban az esetben, ha a *Fab-7* mutációt hordozó kromoszóma egy vad típusú harmadik

kromoszómával párosodik. (Vagyis a transz-helyzetű *Abd-B* mutáció dominánsan szuppresszálja a *Fab-7* mutáció okozta fenotípust). Ha azonban a *Fab-7* mutáció mind cisz-, mind transz-helyzetben jelen van egy *Abd-B* *m* mutációhoz képest (mint például egy *Fab-7/Fab-7Abd-B^{R41}* genotípusú hímekben), akkor a hatodik és a hetedik tergít egyformán keskeny. Annak eldöntésére, hogy ez igaz-e az *Abd-B^{D16}* (*m^r*, null mutáció) esetében is, előállítottunk *Fab-7Abd-B^{D16}* kettős-mutáns kromoszómát hordozó egyedeket a következő módon: *ry⁵⁰⁶Fab-7/Abd-B^{D16}* szüzeket *ry⁵⁰⁶Fab-7/ry⁵⁰⁶Fab-7* hímekkel kereszteztük. Az F1 generációban olyan hímeket kerestünk, amelyeknek a hatodik és a hetedik tergítjük egyformán keskeny. Körülbelül 35000 F1 hím utód között három ilyen egyedet találtunk. E rekombináns-jelölt egyedekben molekuláris módszerrel (teljes genom-*Southern* analízis) a *Fab-7*, míg genetikai módszerrel (komplementációs analízis *Df(3R)P9* delécióval) az *Abd-B^{D16}* mutáció meglétét teszteltük. Vizsgálataink mindkét mutáció jelenlétét kimutatták mindhárom jelölt esetében. Hasonló módszert követve, a *Fab-7* mutációt rekombinációval rávittük az *Abd-B^{D14}*, *UC21-10* illetve *UC21-10,1-d* mutációkat külön-külön hordozó kromoszómákra is.

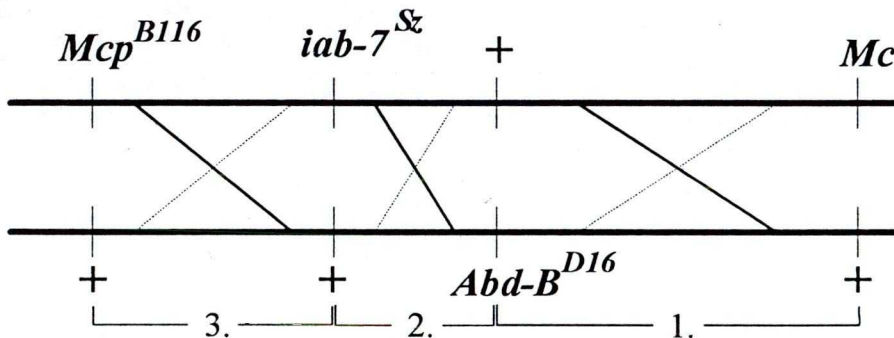
2.4.2. *Mcp^{B116}iab-7^{Sz}Abd-B^{D16}*

Ezt a kromoszómát három, egymást követő rekombinációs lépésben állítottuk elő. Először az *Mcp^{B116}* és az *iab-7^{Sz}* mutációk között izoláltunk rekombinánsokat. Ehhez *Mcp^{B116}/iab-7^{Sz}* szűz nőstényeket *Oregon-R* hímekkel kereszteztünk. Közel

29000 F1 hím utód között két ilyen rekombinánsot találtunk. A második lépésben az *Mc* mutációt rekombinánsoltuk az előzőleg előállított *Mcp^{B116}iab-7^{Sz}* kromoszómára. E kísérlet során *Mcp^{B116}iab-7^{Sz}|Fab-7Mc* szüzeket *Oregon-R* hímekkel pároztattunk. Körülbelül 35000 F1 hím között három olyan egyedet találtunk, akik mutatták az *Mcp*, *iab-7* és *Mc* jellegeket, de ugyanakkor nem voltak *Fab-7* fenotípusúak. Végül, a harmadik lépésben az *Mcp^{B116}iab-7^{Sz}Mc* és az *Abd-B^{D16}* mutációkat hordozó kromoszómák közötti *McpMc⁺* rekombinánsokat kerestük. Ehhez *Dp(3;1)bx^d¹¹/+*; *Abd-B^{D16}|Mcp^{B116}iab-7^{Sz}Mc* szüzeket *Oregon-R* hímekkel kereszteztünk. (A *bx^d¹¹* transzpozíciós duplikáció nélkül az adott genotípusú nőtények nem fertiliznek). Megközelítőleg 90000 F1 hím megvizsgálása során 39 rekombináns egyedet találtunk, amelyek mutatták az *Mcp* jellegét, de nem voltak *Mc* fenotípusúak. Először azt teszteltük, hogy hordoznak-e a rekombinánsok *Abd-B* mutációt. Ezt *Df(3R)P9|Dp(3;3)P5* szüzekkel történő párkeresztezéssel vizsgáltuk. A 39 jelölt közül 8 steril volt, 23 kikelt az *Abd-B* gént is eltávolító *Df(3R)P9* delécióval szemben. Ezek az egyedek azt a kategóriát képviselik, ahol a rekombináció az *Abd-B^{D16}* és az *Mc* mutációk között történt (1. crossing-over régió, következő oldal, 4. ábra). A maradék 8 egyed letálisnak bizonyult hemizigóta állapotban. Noha mindegyikük szuppresszálta a *Fab-7* fenotípust, két teljesen elkülönülő kategóriába sorolhattuk őket: öt esetben az A6 tergít sokkal nagyobb volt a keskeny A7-nél (hasonlóan a *Fab-7|Abd-B^{D16}* hímekhez), míg a maradék három egyednél az A6 és A7 tergitek egyenlően nagyok voltak. Teljes genom-*Southern* analízis révén kimutattuk, hogy az első csoport tagjai csak az *Mcp^{B116}* mutációt hordozzák, vagyis a rekombináció a 3.

crossing-over régióban következett be (4. ábra). Ezzel szemben a második csoport tagjai az Mcp^{B116} és $iab-7^{Sz}$ mutációkat egyaránt hordozzák (a rekombináció a 2. crossing-over régióban következett be, 4. ábra). Hasonló eljárást követve mindhárom rekombináns kategóriát előállítottuk úgy is, hogy az $Abd-B^{D14}$ mutációt használtuk az $Abd-B^{D16}$ allél helyett.

4. ábra. Rekombináció az $Abd-B^{D16}$ és az $Mcp^{B116}iab-7^{Sz}Mc$ kromoszómák között. A számok az egyes crossing-over régiókat jelölik. A folytonos ferde vonal a szelektált, $Mcp^{+}Mc^{+}$, a szaggatott ferde vonal a nem szelektált, $Mcp^{+}Mc^{-}$ rekombinánsok keletkezését jelképezi. (Az ábra nem arányosan tünteti fel az egyes mutációk közötti távolságot.)



2.4.3. $R5^L R7^R$

Ezt a kísérletet arra alapoztuk, hogy a két inverzió, az $In(3R)Fab-7R7$ és az $In(3R)Fab-7R5$ közötti rekombináció által létrejövő, $R5^L R7^R$ kromoszómából hiányzik a 87C1-2; 87D1-4 szakasz. A recesszív *kar* mutáció ezen a régió belül, a 87C8 sávban található (Gausz és mtsai., 1979). A kísérlet során $Tp(3;1)bx d^{11}l+$; $In(3R)Fab-7R5/In(3R)Fab-7R7$ nőtényeket *cu kar/cu kar* hímekhez kereszteztünk és az F1 generációban *kar* fenotípusú egyedeket kerestünk. 138 utód közül hét volt *kar* szemű. Ezekből az egyedekből törzseket alapítottunk és citológiailag megvizsgáltuk

őket. Mind a hét törzs hordozta az *In(3R)87C1-2; 89E3-4* töréspontú inverziót és a *Df(3R)87C1-2;87D1-4* töréspontú deléciót. A rekombináns egyedek életképesek az egyik szülői, az *In(3R)Fab-7R5* kromoszómával, míg letálisak a másik szülői, az *In(3R)Fab-7R7* kromoszómával szemben. A homozigóta rekombináns egyedek szintén életképtelennek bizonyultak.

2.5. A transz-szuppressziót megszüntető kromoszómális átrendeződések izolálása

2.5.1. *TSR, Fab-7* kromoszómák

Fab-7/Fab-7 homozigóta hímeket röntgen-sugárral kezeltünk (4000 rad, 1000 rad/perc, 0,5 mm Al szűrő) majd *Abd-B^{D16}/TM6B,D³* szűzekkel pároztattuk őket. Három nap múlva a hímeket eltávolítottuk és a megtermékenyített, petéző nőstényeket friss táptalajra helyeztük újabb három napra. Így kizártuk annak a lehetőségét, hogy a hím ősvarsejtek mutációja révén keletkező több, azonos mutációt hordozó egyedeket izoláljunk. (A hímivarsejtek képződése ugyanis legalább hat napot vesz igénybe). Az F1 generációban olyan *Fab-7/Abd-B^{D16}* genotípusú hím egyedeket kerestünk, melyeken a *Fab-7* fenotípus szuppressziója megszűnt illetve gyengült, vagyis a hatodik (A6) és hetedik (A7) tergitek egyformán keskenyek, illetve ehhez az állapothoz közelítenek. Körülbelül 3000 megfelelő genotípusú hím utód között 12 ilyen egyedeket találtunk. Ezeket a jelölteket citológiaiailag is megvizsgáltuk és

azt tapasztaltuk, hogy mindegyikük kromoszómális átrendeződéseket hordoz a kritikus szakaszon belül, vagyis a centromer és az *Abd-B* gén közötti, 81A-89E régióban. Ezeket a kromoszómális átrendeződéseket hordozó egyedeket kereszteztük *Cbx¹Ubx¹ITMI* nőstényekhez is, hogy egy másik, független rendszerben is ellenőrizni tudjuk a homológ kromoszómák párosodásának gyengülését. Egy kivétellel az összes jelölt gyengébb *Cbx* (vagy vad) fenotípust mutatott, mint amit a *Cbx¹Ubx¹* mutációt hordozó és egy vad kromoszóma párosodása esetén láthatunk. Az egy kivétel esetében a *bithorax-komplexen* belül, a 89E1-4 régióban volt a töréspont. Mivel nem komplementálta az *abd-A* és *iab-4* mutációkat, ezért ez a töréspont az *iab-4* szakaszon belülre tehető. Így érthető az eltérő hatás a két transzvektációs rendszerben, hiszen a *Cbx¹Ubx¹* esetében a töréspont a kritikus szakaszon kívül, míg a *Fab-7Abd-B* rendszernél a kritikus szakaszon belülre esik. Az általunk izolált új átrendeződések citológiai jellemzése a 2. táblázatban (50. oldal) látható.

2.5.2. *TSR, Fab-7Abd-B^{D16}* kromoszómák

Hasonló módon indukáltunk átrendeződéseket a *Fab-7Abd-B^{D16}* kromoszómán is. Röntgen-sugárral kezelt *Fab-7Abd-B^{D16}ITM6C,Sb* hímeket *Cbx¹Ubx¹ITMI* nőstényekhez kereszteztük. Közel 1500 F1 utód között öt olyan egyedet találtunk, melyeken jelentősen csökkent, vagy egyáltalán nem volt észlelhető a *Cbx* fenotípus. A két legerősebb szuppresszor-hatást mutató jelölt kromoszómáit citológiaiailag is

megvizsgáltuk. Megállapítottuk, hogy az egyik, a *TSR-11A, Fab-7Abd-B^{D16}* egy reciprok transzlokációt (*T(3;4)89A-B;102A*), a másik, a *TSR-59A, Fab-7Abd-B^{D16}* egy deléciót (*Df(3R)88D; 89D*) és egy transzpozíciót (*Tp(3;2)89E;98C;39A*) hordoz.

2.6. Új deléciók izolálása az *Abd-B* génen belül P elem újbóli mobilizációja révén

A *ry⁺* ún. „marker-gént” hordozó *UC21-10* és *UC21-10,1-d* P elem inszerciók 253 bázispárral feljebb („upstream”) helyezkednek el a proximális *Abd-B* promóterhez képest (*McCall* és *mtsai.*, 1994). Annak reményében, hogy ezen P elemek újbóli mobilizációja révén olyan új deléciókat nyerhetünk, melyek az *Abd-B* gén 5' részét eltávolítják, a következő kísérleteket végeztük el. Először rekombinációval rávittük a *Fab-7* mutációt az inszerciókat hordozó kromoszómákra (lásd 2.4.1. fejezet). Az így kapott *Fab-7UC21-10I⁺* és *Fab-7UC21-10,1-dI⁺* egyedek mérsékelt *Fab-7* fenotípust mutatnak, ami csaknem teljesen megszűnik, ha ezen rekombináns kromoszómák egy *Abd-B* null mutációt hordozó kromoszómával vannak szemben (például a *Fab-7UC21-10IAbd-B^{D16}* genotípusú egyedek esetében). Vagyis a *Fab-7UC21-10I⁺* illetve *Fab-7UC21-10,1-dI⁺* egyedek *Fab-7* jellegének nagy része a párosodó homológ, vad kromoszómáról származik, transz-reguláció révén (lásd **Eredmények**). A maradék gyenge, alig észlelhető *Fab-7* fenotípus azzal magyarázható, hogy ezen inszerciós *Abd-B* mutációk nem null, hanem hipomorf allélok (ún. „leakyness”). Ezt igazolja az is, hogy mindkét rekombináns egyed

esetében kaptunk homozigóta túlélőket, *McCall* és *mtsai*. (1994) adataival ellentétben. Az általuk leírt letalitás más egyéb, az inszerciót hordozó kromoszómán az *iab-7* régióhoz képest proximálisan elhelyezkedő (ún. „second site”) mutációknak tudható be. Azt reméltük, hogy a P elemek pontatlan kivágódása révén keletkező deléciók eltávolítják az *Abd-B* gén jelentős részét, és ezáltal teljesen megszűnik az a gyenge *Fab-7* jelleg, ami megfigyelhető a *Fab-7UC21-10|Abd-B^{D16}* heterozigóta nőstények hatodik szternitjén. Ugyanakkor eredményeink alapján feltételeztük, hogy a P elemek pontatlan kivágódása révén keletkező, az *Abd-B* gén proximális promóterét eltávolító deléció következtében az *iab-7* cisz-regulátor erősebb transz-regulációra lesz képes, mint egy ép, cisz-helyzetű *Abd-B* promóter jelenlétében. Azt vártuk, hogy az így felerősödött transz-reguláció miatt látható lesz a *Fab-7* jelleg, ha ezek az *Abd-B* gén 5' végén deléciókat hordozó kromoszómák vad (ép *Abd-B* gént hordozó) kromoszómával párosodnak, szemben azzal, amikor a *Fab-7* mutációhoz képest cisz-helyzetű, null mutációt hordozó *Abd-B* gén promótere ép (a *Fab-7Abd-B^{D16}|+* nőstények ugyanis nem *Fab-7* jellegűek). Ezek alapján *Fab-7UC21-10|TM3,SbΔ2-3* és *Fab-7UC21-10,1-d|TM3,SbΔ2-3* genotípusú, ún. „jump-starter” hímeket állítottunk elő keresztezéssel, melyeket *Dp(3;1)bx^{d11}|Dp(3;1)bx^{d11}* ; *ry⁵⁰⁶Abd-B^{D16}|ry⁵⁰⁶Abd-B^{D16}* nőstényekhez kereszteztünk. Az F1 nőstény utódok között a P elem kivágódása révén keletkező, olyan *ry* egyedeket kerestünk, amelyek egyáltalán nem *Fab-7* fenotípusúak (a hatodik szterniten lévő nagy szőrök hegyükkel kifelé állnak). Megközelítőleg 20000 légy megvizsgálása során kilenc ilyen jelöltet találtunk, melyeket egyedileg *Oregon-R*

hímekhez kereszteztünk, hogy ellenőrizhessük, vannak-e közöttük olyanok, amelyek *Fab-7* jelleget mutatnak ilyen körülmények között. Mind a kilenc jelölt esetében észleltünk részleges A6 → A7 irányú transzformációt (*Fab-7* jelleget), melyet felhasználva el tudtuk különíteni a feltételezhetően deléciót hordozó kromoszómákat a $ry^{506}Abd-B^{D16}$ kromoszómáktól. Az új mutánsainkat összehasonlítottuk egymással az alapján, hogy mennyire képesek fenotípusosan komplementálni azt a teljes mértékű A7 → A6 irányú transzformációt, amit akkor látunk, ha az egyik harmadik kromoszómán egy *Abd-B* pontmutáció, míg a másikon az *iab-7^{Sz}* deléció található. Két esetben igen erős komplementációt észleltünk (erősen lecsökkent az A7 tergite mérete). Mivel ezen két mutáció letálisnak bizonyult mind a *Df(3R)P9* delécióval mind az *m^r*, null mutáns *Abd-B^{D16}* alléllal, elneveztük őket *Abd-B^{PSz1}* (az egyikópiás *UC21-10,1-d* inszertből származik) illetve *Abd-B^{PSz2}* (a kétkópiás *UC21-10* tandem-inszertből származik) allélnak. A homozigóta embriók központi idegrendszerében csak a PS14-ben tudtunk kimutatni festődést ABD-B fehérje ellen készített ellenanyaggal, vagyis az alléljaink az *Abd-B* *m* funkcióra nézve null allélnak bizonyultak. Teljes genom-*Southern* analízis révén megállapítottuk, hogy az *Abd-B^{PSz1}* allélban 10,8 kilobázis hiányzik (a molekuláris térképen a 155,6-156,8; 165,6-166,6 tartomány), 3,2 kb „downstream” és 7,6 kb „upstream” az inszerció helyéhez képest. Az *Abd-B^{PSz2}* mutációt egy 5,5 kb méretű deléció okozza (a baloldali töréspont szintén a 155,6-156,8 tartományba esik, míg a jobboldali töréspont helyzete 160,2-161,3), ebből 3,2 kb „downstream” és 2,3 kb „upstream” helyezkedik el az inszerció helyéhez (159, McCall és mtsai., 1994) viszonyítva.

3. EREDMÉNYEK

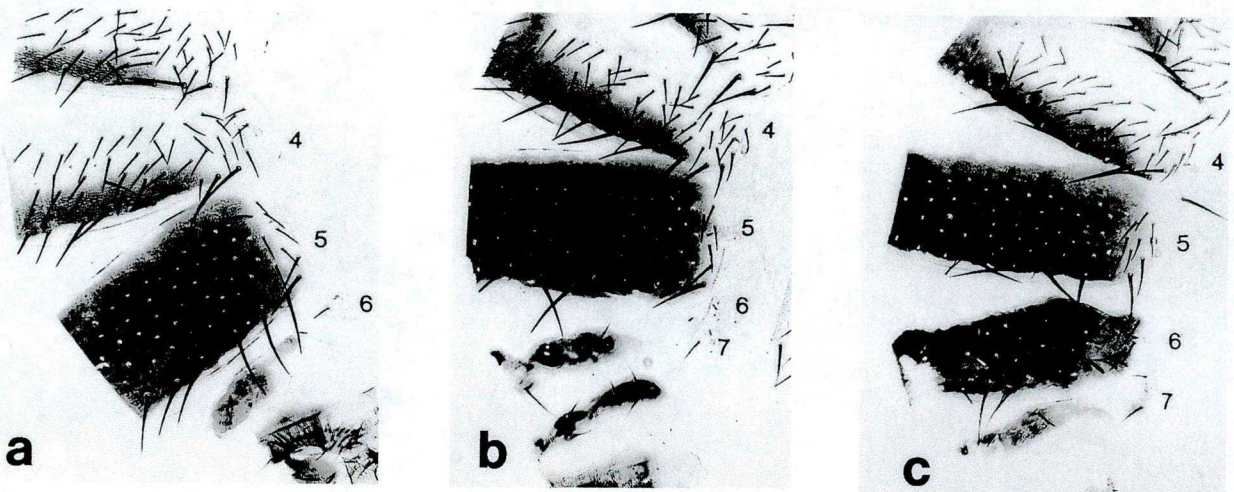
Az *Abd-B* m géntermék szintje az egymást követő potrohszelvényekben egyre magasabb, az ötödiktől (A5) a nyolcadikig (A8) (Celniker és mtsai., 1989). Ha ez a szint az A7-ben a normális szint felére - a vad A6 és A7 közötti szintre - csökken, akkor a hímeknek egy keskeny, csökevényes hetedik szelvénye jelenik meg, ami fenotípusosan egyfajta „átmenet” a széles fekete hatodik és a normálisan nem látható hetedik tergít között (a hetedik szelvény ebben a nemben ugyanis nem járul hozzá az adult kutikulához). Ezt a fenotípust kétféleképpen is előidézhetjük: vagy a két *Abd-B* gén közül az egyik kópiát rontjuk illetve távolítjuk el, vagy az egyik *iab-7* cisz-regulátorral tesszük ugyanezt meg (126. oldal, 29/c ábra) (ez a szabályozó elem határozza meg ugyanis a hetedik szelvényre jellemző *Abd-B* géntermék-szintet).

A domináns, neomorf *Fab-7* mutáció eltávolít egy izolátor elemet az *Abd-B* doménből, mely az *iab-6* és *iab-7* cisz-regulátor elemeket választja el. A deléciónak következtében az *iab-7* régió a normálisnál már egy szelvénnel előrébb, az A6-ban aktívvá válik. Ennek megfelelően, a *Fab-7* mutáció hatására a muslicák hatodik potrohszelvénye hetedikké módosul. E mutációra heterozigótákban (a homozigótákkal ellentétben) ez a homeotikus transzformáció nem teljes: a *Fab-7I+* heterozigóta hímeken látható egy csökevényes hatodik szelvény (126. oldal, 29/a ábra), hasonló, mint az *iab-7^{SzI}+* heterozigóta hímek hetedik szelvénye (126. oldal, 29/c ábra). Noha a mutációk különbözőek, a szelvények pozíciója is más, a két szelvény mégis hasonló kinézetű, mert mindkettőben egy kópia *iab-7* cisz-regulátor aktív. Az

A6 és A7 hasonlóságára egy egyeden belül is találhatunk példát a transz-heterozigóta *Fab-7*iab-7*^{Sz}* hímek esetében: egyformán csökevényes mind a hatodik, mind a hetedik szelvényük (55. oldal, 7. ábra), hiszen mindkettőben egy (és ráadásul egyazon) *iab-7* elem működik. Ezzel teljesen megegyező fenotípust kapunk, ha nem csak az egyik *iab-7* régiót, hanem vele együtt a cisz-helyzetű *Abd-B* gént is eltávolítjuk, például a *Df(3R)P9*Fab-7** hemizigótában (5/b ábra).

A transz-helyzetű *Abd-B* gén pontmutációi dominánsan szuppresszálják a *Fab-7* fenotípust. Az előbbihez hasonló fenotípus várható akkor is, ha nem eltávolítjuk, hanem egy pontmutáció segítségével elrontjuk a *Fab-7* mutációval transz-helyzetű *Abd-B* gént, hiszen ebben az esetben is csak egy működőképes (a *Fab-7* mutációval cisz-helyzetű) *Abd-B* gén van jelen. A *Fab-7*Abd-B*^{D16}* hímek hetedik tergite teljesen meg is egyezik a *Df(3R)P9*Fab-7** hímek hetedik tergitéjével (5/b-c ábra). A *Fab-7*Abd-B*^{D16}* hímek hatodik tergite azonban jelentősen nagyobb a saját hetedik, illetve a *Df(3R)P9*Fab-7** hímek hatodik tergitéjénél (5/b-c ábra).

5. ábra. Adult kutikula-készítmények (a.) *Fab-7*⁺, (b.) *Fab-7*/*Df(3R)P9* és (c.) *Fab-7*/*Abd-B*^{D16} hímekből.



Ilyen eredményt kaptunk más, a transz-helyzetű *Abd-B* gént elrontó egyéb pontmutációk esetében (*Abd-B^{Sl}*, *Abd-B^{S4}*, *Tiong* és *mtsai.*, 1985) is. Vagyis, a transz-helyzetű *Abd-B* pontmutációk dominánsan szuppresszálják a *Fab-7* fenotípust (a hatodik tergít mérete megnő a *Fab-7I+* heterozigótákéhoz képest, közelít a vad típushoz). A *Fab-7* fenotípus mértékét egyfajta indikátornak tekinthetjük, ami az *Abd-B* géntermék szintjét jelzi a hatodik potrohszelvényben (lásd *Fab-7* homo- és heterozigóta, 28. illetve 29. ábra, 124. illetve 126. oldal). Ez alapján, a szuppressziót azzal magyarázhatjuk, hogy a *Fab-7IAbd-B^{D16}* heterozigótákban az *Abd-B* géntermék szintje lecsökken a *Fab-7I+* heterozigótáknak megfelelő szint alá.

A transz-szuppresszió függ a homológ kromoszómák párosodásától. A *Lewis*-modell (1982, 24. ábra, 117. oldal) és az eddigi ismereteink alapján az egyes cisz-regulátorok hatása egy adott szelvényben nem összegződik, vagyis a szelvény-specifikus *Abd-B* szintet - a szelvény identitását - mindig az adott szelvényben először aktív, arra a szelvényre specifikus szabályozó régió határozza meg. Ezzel összhangban a *Fab-7I+* hetero- és *Fab-7IDf(3R)P9* hemizigóták A6-ja egyformán keskeny. Ez alapján viszont nem érthető, hogy miért különbözik a *Fab-7IAbd-B^{D16}* és *Fab-7IDf(3R)P9* hímek hatodik potrohszelvénye, hiszen egy kópia működőképes *Abd-B* gén (ráadásul ugyanaz) van jelen mindkét esetben. A két különböző eredményre vezető kombinációt megvizsgálva arra a következtetésre jutottunk, hogy a rejtély kulcsa valószínűleg a két mutáció (a pontmutáció illetve a deléció) eltérő „természetében” rejlik. Kipróbáltuk, hogy változik-e a szuppresszió, ha kromoszómális átrendeződések révén meggátoljuk a homológok párosodását a *Fab-7IAbd-B^{D16}*

transz-heterozigótákban (a *Fab-7IDf(3R)P9* hemizigótákban erre ugyanis nincs lehetőség a *BX-C* területén). E célból *Fab-7* homozigóta hímeket röntgen-sugárral kezeltünk és kereszteztük őket az *Abd-B^{D16}* mutációra heterozigóta nőstényekkel (lásd **Anyagok és módszerek**). Az F1 generációban olyan hím utódokat kerestünk, melyeknél a *Fab-7* fenotípus szuppressziója megszűnt illetve meggyengült, vagyis az A6 mérete lecsökkent a kontrollként használt, röntgennel nem kezelt *Fab-7/Abd-B^{D16}* heterozigótákhoz képest. Körülbelül 3000 hím utód között 12 olyan fenotípusú jelöltet találtunk, melyek hatodik és a hetedik tergitje egyformán keskeny volt, hasonló, mint a (*Fab-7IDf(3R)P9*) hemizigótáké (47. oldal, 5/b ábra). Ezek után ellenőriztük, hogy egy másik, független, *transzvekiót* mutató rendszerben befolyásolják-e ezek az új mutációk a homológ kromoszómák párosodását. Hogy ezt eldöntsük, jelöltjeinket *Cbx¹Ubx¹* kettős mutációt hordozó egyedekkel kereszteztük. Abban az esetben ugyanis, ha a jelöltek harmadik kromoszómáján olyan átrendeződések keletkeztek, melyek gátolják a párosodást a *bithorax-komplex* környezetében, megszűnik vagy legyengül az a gyenge *Cbx* jelleg, amit akkor tapasztalunk, ha a *Cbx¹Ubx¹* kromoszóma struktúráisan vad típusú (átrendeződésektől mentes) kromoszómával párosodhat (be nem mutatott adat). Ha a jelöltjeink nem módosítják a *Cbx* fenotípus mértéket, akkor fel kell tételeznünk, hogy olyan mutációkat indukáltunk, melyek vagy erősítik a *Fab-7* jellegét, vagy valamilyen más módon gátolják a *Fab-7* fenotípus szuppresszióját. Megállapítottuk, hogy a tizenkét jelöltünk a *Cbx¹Ubx¹* kromoszómával szemben egy kivételével gyengébb *Cbx* (vagy vad) fenotípust eredményez a kontrollként használt *Cbx¹Ubx¹/+* legyekhez képest (be nem mutatott adat).

A jelöltek citológiai vizsgálata során egy kivételével olyan átrendeződéseket észleltünk, melyeknek az egyik töréspontja a harmadik kromoszóma centromerje és a 89E1-4 régió (a *BX-C* területe) közé esik (2. táblázat). Egyetlen esetben az egyik töréspont a *BX-C* területén belül helyezkedik el. Komplementációs analízissel megállapítottuk, hogy ez a töréspont az *iab-4* régióba tehető. Így érthető, hogy miért viselkedik ez az átrendeződés eltérően a két különböző kísérleti rendszerben: az *iab-4* régió ugyanis a két gén között (116. oldal, 23. ábra), az *Ubx*-től disztálisan (itt a kritikus régió kívül), míg az *Abd-B*-től proximálisan (e rendszerben a kritikus régió belül) helyezkedik el. Megállapítható tehát, hogy a transz-helyzetű *Abd-B* gén pontmutációi a homológ kromoszómák párosodásától függően szuppresszálják a *Fab-7* fenotípust, vagyis e jelenség a *transzvekción* egy esete.

2. táblázat. Az általunk izolált, a *Fab-7* fenotípus transz-szuppresszióját gátló kromoszómális átrendeződések listája. Csak a kritikus régióban lévő töréspontok vannak feltüntetve.

<i>TSR-Sz-X,Fab-7</i>	Citológia	Megjegyzés
1.	T(2;3)2R heterokromatin ; 89B	nagyon erős hatás
2.	heterokromatin ; 87B	
3.	T(2;3)2R heterokromatin ; 87F-88A	
4.	In(3LR)79E-80A ; 89E	nagyon erős hatás, <i>iab-4</i>
5.	In(3R)heterokromatin ; 90E-F	nagyon erős hatás
6.	T(2;3)26A ; 3R heterokromatin	
7.	T(2;3)28E ; 87B8,9	
8.	T(2;3)59B-C ; 81F	
9.	In(3R)81F ; 88B	
10.	T(2;3)58F ; 3R heterokromatin	homozigóta életképes, fertilis
11.	In(3LR)62B;81F	homozigóta életképes, fertilis
12.	T(Y;3R)Y ; 87B	gyenge hatás

A szuppresszió az *Abd-B* gén inproduktív transz-regulációjának következménye. Ha összevetjük a *Fab-7I+* és *Fab-7IAbd-B^{D16}* hímek hatodik tergítjének méretét (47. oldal, 5/a és 5/c ábra), akkor belátjuk, hogy a *Fab-7I+* heterozigótákban a transz-helyzetű *Abd-B* gén is hozzájárul a fenotípus kialakításához, hiszen épp e transz-hatás elvesztése okozza a *Fab-7* fenotípus szuppresszióját a *Fab-7IAbd-B^{D16}* heterozigótákban. Ugyanakkor a *Fab-7IDf(3R)P9* hemizigótákban (47. oldal, 5/b ábra) egy kópia *iab-7* elem egy működőképes, cisz-helyzetű *Abd-B* gént szabályozva az A6-ban képes a *Fab-7I+* heterozigótákhoz hasonló mértékű *Fab-7* jelleg - *Abd-B* szintet - kialakítani. Ezt az ellentmondást két alternatív modell révén oldhatjuk fel:

1. A *Fab-7I+* heterozigóták A6-jában egy aktív és egy inaktív állapotú *iab-7* elem párosodik, ezáltal kölcsönhatásba lépnek egymással. E kölcsönhatás eredményeként a „teljesen aktív” *iab-7* kevésbé lesz aktív, részlegesen inaktiválódik, a „teljesen inaktív” *iab-7* pedig kevésbé lesz inaktív, részlegesen aktiválódik. A két részlegesen aktív *iab-7* cisz-regulátor hatására mindkét *Abd-B* gén résztvesz e szelvényre jellemző *Abd-B* géntermékszint kialakításában. Ha az *iab-7* régiók egymásra gyakorolt, ellentétes hatása azonos mértékű, akkor az eredmény (az *Abd-B* géntermék mennyisége) megegyezik azzal az esettel, amikor - párosodás hiányában - nincs mód ilyen kölcsönhatásokra, ezért hasonló lesz a *Fab-7* hetero- (*Fab-7I+*) és hemizigóták (*Fab-7IDf(3R)P9*) A6-ja. A *Fab-7IAbd-B^{D16}* transz-heterozigótákban viszont az *Abd-B* mutáció miatt elvész a vele cisz-helyzetű *iab-7* elem részleges aktiválódása, megmarad viszont a *Fab-7* kromoszómán lévő *iab-7* elem részleges inaktiválódása. Ennek eredménye a szuppresszált *Fab-7* jelleg.

2. Tegyük fel, hogy az *iab-7* régió aktiváló képessége korlátozott. A *Fab-7IDf(3R)P9* hemizigótákban az egy meglévő *iab-7* cisz-regulátor teljes kapacitással aktiválja az egyetlen elérhető, cisz-helyzetű *Abd-B* gént. A *Fab-7I+* heterozigóták A6-jában azonban az egyedül aktív *iab-7* elem hatása megoszlik a cisz- és transz-helyzetű *Abd-B* gének között. Az utóbbira eső rész elfecsérelődik a *Fab-7IAbd-B^{D16}* transz-heterozigótákban a hibás *Abd-B* gén miatt, ami a *Fab-7* fenotípus szuppresszióját okozza. Ha a párosodást kromoszómális átrendeződések révén meggátoljuk, megszűnik a szuppresszió, mert az aktív *iab-7* régió csak a cisz-helyzetű, működőképes *Abd-B* gént tudja elérni, azt aktiválja teljes kapacitással, hasonlóan, mint a *Fab-7IDf(3R)P9* hemizigótákban.

Hogy eldöntsük, a két lehetőség közül melyik a helyes, rekombináció segítségével eltávolítottuk a cisz-helyzetű *iab-7* régiót a mutációt hordozó *Abd-B* gén mellől (lásd **Anyagok és módszerek**). Ebben az esetben nincs mód két eltérő állapotú *iab-7* elem közötti kölcsönhatásra. Ha az *iab-7^{Sz}Abd-B^{D16}I**Fab-7* hímekben megszűnik a szuppresszió, akkor az első magyarázat az igaz, ha továbbra is megmarad, akkor pedig a második modell a helyes. A 6. ábrán (következő oldal) látható, hogy az *iab-7^{Sz}Abd-B^{D16}I**Fab-7* és *Fab-7IAbd-B^{D16}* hímek hatodik tergitje teljesen megegyező méretű. Vagyis az A6-ban inaktív, párosodó *iab-7* régió nem játszik szerepet a transz-szuppresszióban, hiszen hiányában nem változik meg a fenotípus. A szuppresszió tehát annak a következménye, hogy az *iab-7* régió aktiváló hatása megoszlik a párosodó, cisz- és transz-helyzetű *Abd-B* gén között, a transz-helyzetűre jutó hányad viszont kárba vész a génben lévő mutáció miatt.

6. ábra. Adult kutikula-készítmények (a) *Fab-7/Abd-B^{D16}* és (b) *Mcp^{B116};iab-7^{Sz}Abd-B^{D16}|Fab-7* hímekből.

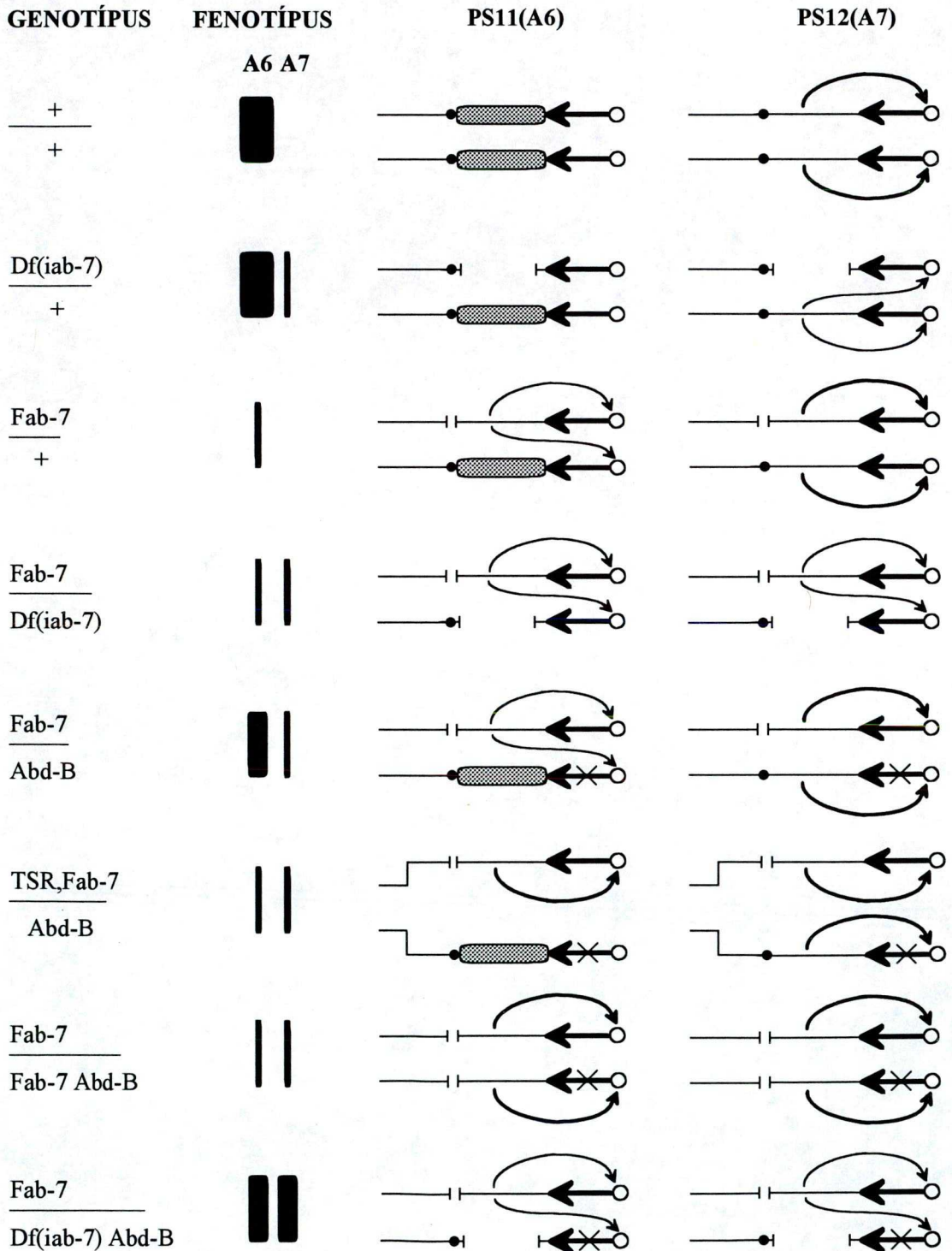


Transz-reguláció akkor mutatható ki, ha csak az egyik *iab-7* régió aktív. A

6. ábrán az is látható, hogy a *iab-7^{Sz}Abd-B^{D16}|Fab-7* hímeknek a hetedik tergite a hatodikkal azonos méretű. Ugyanakkor jelentősen eltér a *Fab-7|Abd-B^{D16}* és az *iab-7^{Sz}Abd-B^{D16}|Fab-7* hímek hetedik tergitének a mérete. Ehhez kapcsolódik egy másik probléma, mely felett eddig elsíklottunk: miért különböző méretű a *Fab-7|Abd-B^{D16}* hímek hatodik és hetedik tergite? Úgy tűnik, hogy e genotípusban a hetedik szelvényben (a hatodikkal ellentétben) nem alakul ki az *Abd-B* géntermék összmenyiségét csökkentő, improduktív transz-reguláció. A transz-reguláció viszont nem lehet csak az A6-ra jellemző specifikus jelenség, hiszen létrejön az *iab-7^{Sz}Abd-B^{D16}|Fab-7* hímek hatodik és hetedik szelvényében egyaránt. E két szelvényben csak egy, aktív *iab-7* van. A *Fab-7|Abd-B^{D16}* hímek A6-jában egy aktív és egy inaktív, míg az A7-ben két aktív *iab-7* található. Az inaktív *iab-7*-ről

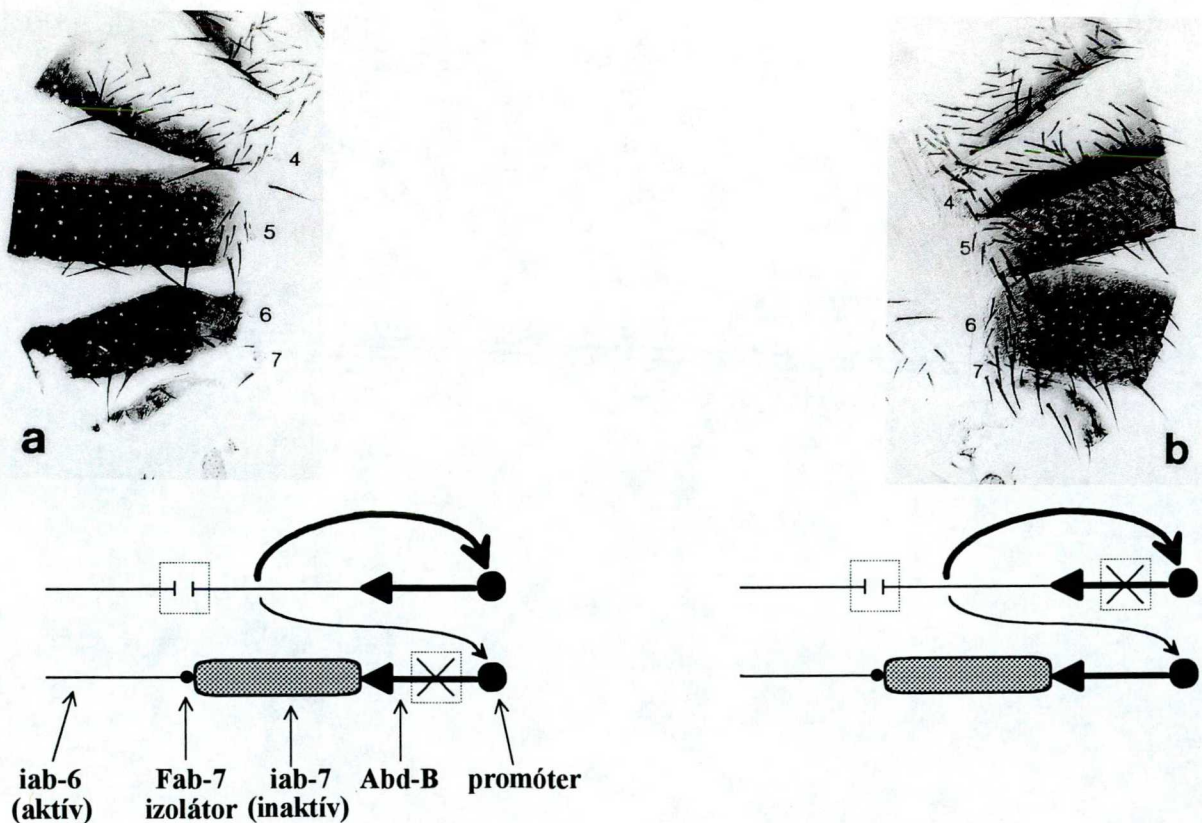
tudjuk, hogy nincs, vagy elhanyagolható szerepe van a *Fab-7* jelleg szuppressziójában, hiszen ha hiányzik, nem módosul az A6 fenotípusa (lásd 53. oldal 6/a-b). Ezek alapján feltételeztük, hogy azokban a szelvényekben, melyekben mindkét *iab-7* aktív, nem alakul ki transz-reguláció. Ennek igazolására rekombinációval rávittük a *Fab-7* delécióát az *Abd-B^{D16}* mutációt hordozó kromoszómára. A *Fab-7/Fab-7Abd-B^{D16}* egyedek hatodik és hetedik szelvényében egyaránt két aktív *iab-7* van. A kísérlet igazolta feltevésünket, mindkét tergít egyformán keskeny az ilyen hímeken (következő oldal, 7. ábra). Eddigi eredményeinket összefoglalva tehát megállapítható, hogy azokban a szelvényekben, melyekben csak egy aktív *iab-7* régió van, annak aktiváló képessége megoszlik a cisz- és transz-helyzetű (ha van) *Abd-B* gének között, amennyiben a homológ kromoszómák párosodnak. Azokban a szelvényekben viszont, melyekben két aktív *iab-7* régió található, nem jön létre megoszlás (transz-reguláció), mindkét *iab-7* elem a saját - cisz-helyzetű - *Abd-B* génjét szabályozza. Másik lehetőség, hogy ilyenkor „kettős transz-reguláció” alakul ki, mindkét *iab-7* elem szabályozza a cisz- és a transz-helyzetű *Abd-B* gént is, de az *iab-7* „elvesztett-visszakapott” aktiváló hatásának mértéke egyforma, ezáltal nem csökken *Abd-B* géntermék össz mennyisége. Ez utóbbi lehetőség azonban - véleményünk szerint - kevésbé valószínű (lásd **Eredmények megvitatása**). Az eddig leírt fontosabb geno- és fenotípusokat, továbbá a különböző regulációs viszonyokat a következő oldalon látható 7. ábrán összefoglaltam.

7., összefoglaló ábra. A folytonos vonal az aktív állapotú cisz-regulátorokat (*iab-6* és *iab-7*), közöttük a fekete pont a szigetelő *Fab-7* régió jelenlétét, illetve hiányát a függőleges vonal jelzi. A pontokkal kitöltött fekvő téglalap az inaktív állapotú *iab-7* régiót, üres kör a promotert, a vastag fekete nyíl az *Abd-B* transzkripciót jelöli, X az *Abd-B* pontmutációt jelöli. Az ábrán csak az *iab-7* regulációs viszonyai vannak feltüntetve (görbe nyilak).



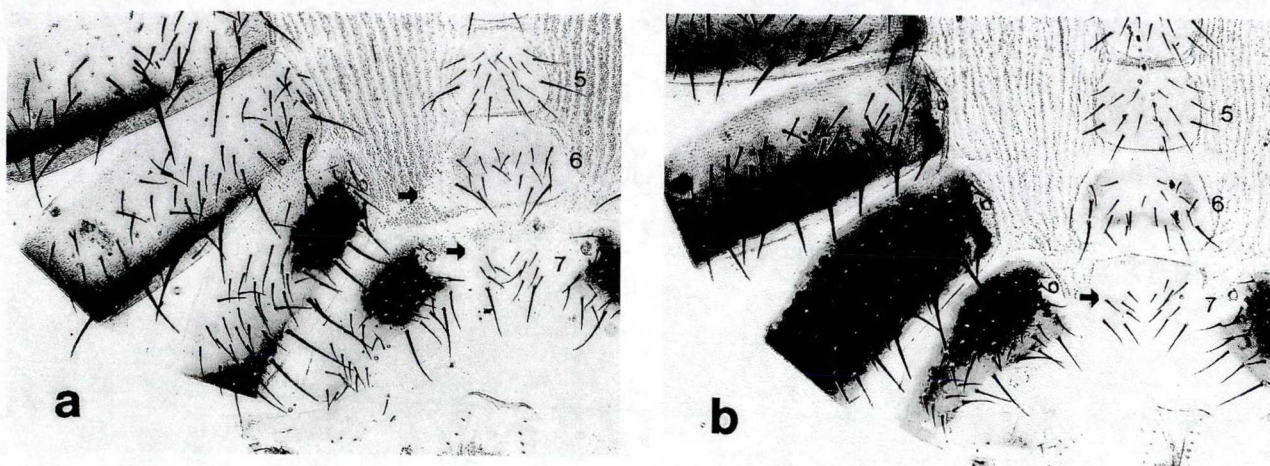
Az *iab-7* elem aktiváló hatása egyenlőtlenül oszlik meg a cisz- és a transz-helyzetű *Abd-B* gén promótere között. Egyenlő megoszlás feltételezve a *Fab+1+Abd-B* és *Fab-7Abd-B1++* heterozigóták fenotípusa megegyezne. Ezzel szemben, a *Fab-7Abd-B^{D16}* transz-heterozigóttól eltérően, a *Fab-7Abd-B^{D16}+* cisz-heterozigóta egyedeken nem figyelhető meg *Fab-7* jelleg (A6 → A7 irányú transzformáció), ami azzal magyarázható, hogy a transz-reguláció mértéke nem elégséges a látható *Fab-7* fenotípushoz szükséges *Abd-B* szint kialakításához (8. ábra). Megállapítható tehát, hogy az *iab-7* elem aktiváló hatásából a cisz-helyzetű *Abd-B* promóterre nagyobb hányad jut.

8. ábra. Adult kutikula-készítmények (a) *Fab-7Abd-B^{D16}* és (b) *Fab-7Abd-B^{D16}+* hímekből. A nyilak vastagsága az eltérő erősségű cisz- illetve transz-regulációt szemlélteti. A négyzetek a két mutáció egymáshoz viszonyított helyzetére hívják fel a figyelmet.



Az *Abd-B* gén 5' végét eltávolító deléciók módosítják a cisz- és transz-reguláció arányát. Hasonlóan az *Abd-B^{D16}* allélhez, nem észlelünk *Fab-7* jelleget az *Abd-B^{R3}* (*m^r*) és az *Abd-B^{R41}* (*m^r*) mutációk esetében sem. Az *Abd-B^{D14}* (*m^r*) allél jelenlétében viszont igen: a *Fab-7Abd-B^{D14}/+* nőtények hatodik szternitjén a szőrök hegyükkel befelé mutatnak (9/a ábra), ami az A6 → A7 irányú transzformáció következménye.

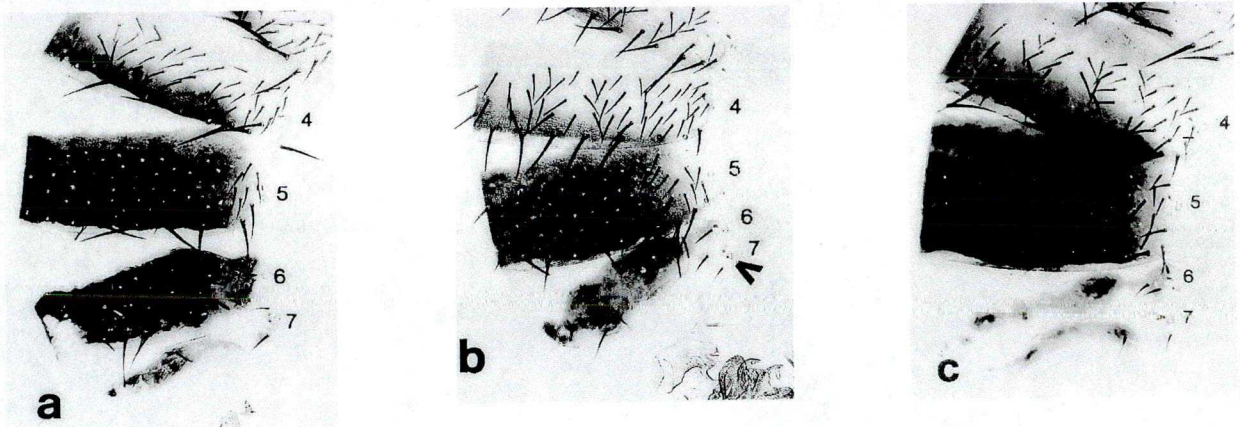
9. ábra. Adult kutikula-készítmények (a) *Fab-7Abd-B^{D14}/+* és (b) *Fab-7Abd-B^{D14}/In(3LR)TM3* nőtényekből. A nyilak a hetedik potrohszervre jellemző trichóma-hiányra hívják fel a figyelmet.



A kivételes körülmények között ritkán túlélő és felnövő, homozigóta *Fab-7Abd-B^{D14}*, illetve a hemizigóta *Fab-7Abd-B^{D14}/Df(3R)P9* egyedek esetében nem figyelhető meg ez a gyenge, de egyértelműen *Fab-7* jelleg, megerősítvén azt, hogy az *Abd-B^{D14}* egy null allél. Megállapítottuk, hogy a *Fab-7Abd-B^{D14}/+* egyedek *Fab-7* fenotípusa a homológ kromoszómán lévő, ép *Abd-B* gén transz-regulációjának a következménye. Ennek megfelelően, a *Fab-7* jelleg nem látható olyan esetekben, ha a homológok párosodása gátolt (például *Fab-7Abd-B^{D14}/In(3LR)TM3* heterozigótákban, 9/b ábra).

Ugyanakkor az *Abd-B^{D14}* allél kevésbé szuppresszálja a *Fab-7* fenotípust, mint más *Abd-B* pontmutációk (lásd A6 mérete, **10/a-b** ábra). Emellett a *Fab-7/Abd-B^{D14}* hímeken nem látható hetedik tergít, mert az *Abd-B* domén haploid-elégtelensége miatt jelentkező A7 → A6 irányú transzformáció is gyengébb, mint a szintén null allél *Abd-B^{D16}* esetében (lásd A7 mérete, **10/a-b** ábra). Ha azonban gátoljuk a homológ kromoszómák párosodását, ez a mutáns jelleg megerősödik, míg a *Fab-7* fenotípus szuppressziója teljesen megszűnik (lásd A7 illetve A6 mérete, **10/b-c** ábra).

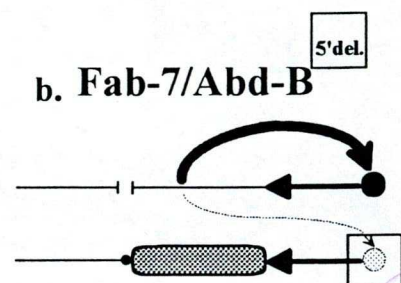
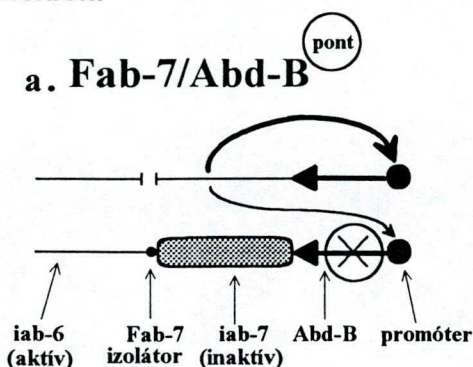
10. ábra. Adult kutikula-készítmények (a) *Fab-7/Abd-B^{D16}*, (b) *Fab-7/Abd-B^{D14}* (c) és *TSR-Sz-1, Fab-7/Fab-7/Abd-B^{D14}* hímekből. A nyílhegy a hetedik potrohszelvény légzőnyílása mellett látható szőrre hívja fel a figyelmet, ami a leggyengébb jele az A7 → A6 irányú transzformációnak.



Az *Abd-B^{D14}* (az *Abd-B^{D16}* mutációval ellentétben) nem pontmutáció, hanem egy 411 bázispár méretű deléció a gén 5' végén, ebből 66 bázispár a transzkripció iniciációs helyétől „felfelé” (upstream) esik (Zavortnik és Sakonju, 1989). Hasonló jellegű mutációk léteznek a *BX-C* más területén: Martinez-Laborda és munkatársai (1992) kimutatták, hogy amennyiben az *Ubx* gén promótere hiányzik, illetve idegen DNS-szakasz ékelődik bele, akkor párosodás esetén teljesen visszaszorul az *Ubx* gén hibája miatt egyébként látható mutáns fenotípus. Megállapították, hogy a promóter

régió elrontása vagy hiánya miatt a regulátor elemek képtelenek cisz-helyzetű kapcsolatot létesíteni és a transz-helyzetű gént szabályozzák. A homológ kromoszómák párosodása esetén a mutáns fenotípus azért nem észlelhető, mert az ép gén „hiperaktiválódik”, ugyanis a cisz- és transz-helyzetű regulátorok egyaránt aktiválják. Úgy tűnik tehát, hogy az $Abd-B^{D14}$ allél különös viselkedése is annak a következménye, hogy a promóter régiója (részleges vagy teljes) hiánya miatt kevésbé köti a szabályozó elemeket, ezáltal módosul a cisz- és transz-reguláció aránya ahhoz az állapothoz képest, mint amikor az $Abd-B$ gén promótere ép (például az $Abd-B^{D16}$ allélben). Ennek megfelelően, a $Fab-7Abd-B^{D14}/+$ egyedek (57. oldal, 9. ábra) $Fab-7$ jellege azzal magyarázható, hogy az A6-ban az $iab-7$ által létrehozott cisz-helyzetű kapcsolat meggyengül, ezáltal viszont a transz-reguláció kellőképpen felerősödik ahhoz, hogy fenotípusos következménye legyen. Ugyanezen elv alapján az $Abd-B^{D14}/Fab-7$ heterozigóták hatodik potrohszelvényében a cisz- és transz-reguláció aránya épp ellentétesen változik az $iab-7$ vonatkozásában (11. ábra). Ezzel magyarázható, hogy ez az $Abd-B$ allél gyengébben szuppresszálja a $Fab-7$ fenotípust, mint a pontmutáns allélok (58. oldal, 10. ábra)

11. ábra. A cisz- és transz-reguláció aránya az A6-ban az (a) $Abd-B^{D16}$ és (b) $Abd-B^{D14}$ allélok esetében.



Rendelkezésünkre álltak olyan P elem okozta inszerciók, melyek az *Abd-B* gén 5' végén található (McCall és mtsai., 1994). Megállapítottuk, hogy az *Ubx* génnél leírtakkal megegyezően, ezek a mutációk is a transz-helyzetű gén hiperaktivációját okozzák, akárcsak az *Abd-B^{D14}* allél (a heterozigóta hímekben hetedik tergít nem látható, lásd 10. ábra, 58. oldal). Ezen P elemek mobilizációja révén (lásd **Anyagok és módszerek**) két olyan új deléciót sikerült izolálnunk, melyek az *Abd-B^{D14}* allélhoz képest további részeit távolítják el az *Abd-B* gén „upstream” régiójának (*Abd-B^{PSz2}* és *Abd-B^{PSz1}*, 2.3 kb illetve 7.6 kb). Két egyéb (*Abd-B^{RD18}* és *Df(3R)U110*, Hopmann és mtsai., 1995), hasonló jellegű deléciót hordozó *Abd-B* alléllal együtt kipróbáltuk, hogy az *Abd-B* gén „upstream” régiójának eltérő mértékű hiánya befolyásolja-e a transz-reguláció erősségét. Azt vizsgáltuk, hogy változik-e a hetedik tergít mérete akkor, ha különböző, deléciót hordozó *Abd-B* mutációk vannak az *iab-7^{Sz}* delécióval szemben, azaz mennyire képes a két mutáció egymás hatását komplementálni. Alapállapotnak az *iab-7^{Sz}/Abd-B^{D16}* hímek hetedik tergítjét tekintettük, mely a hatodik tergíttel megegyező méretű ebben a genotípusban (be nem mutatott adat). Az egyes deléciós allélok esetében a következő sorrendet tudtuk felállítani a hetedik tergít egyre csökkenő mérete alapján:

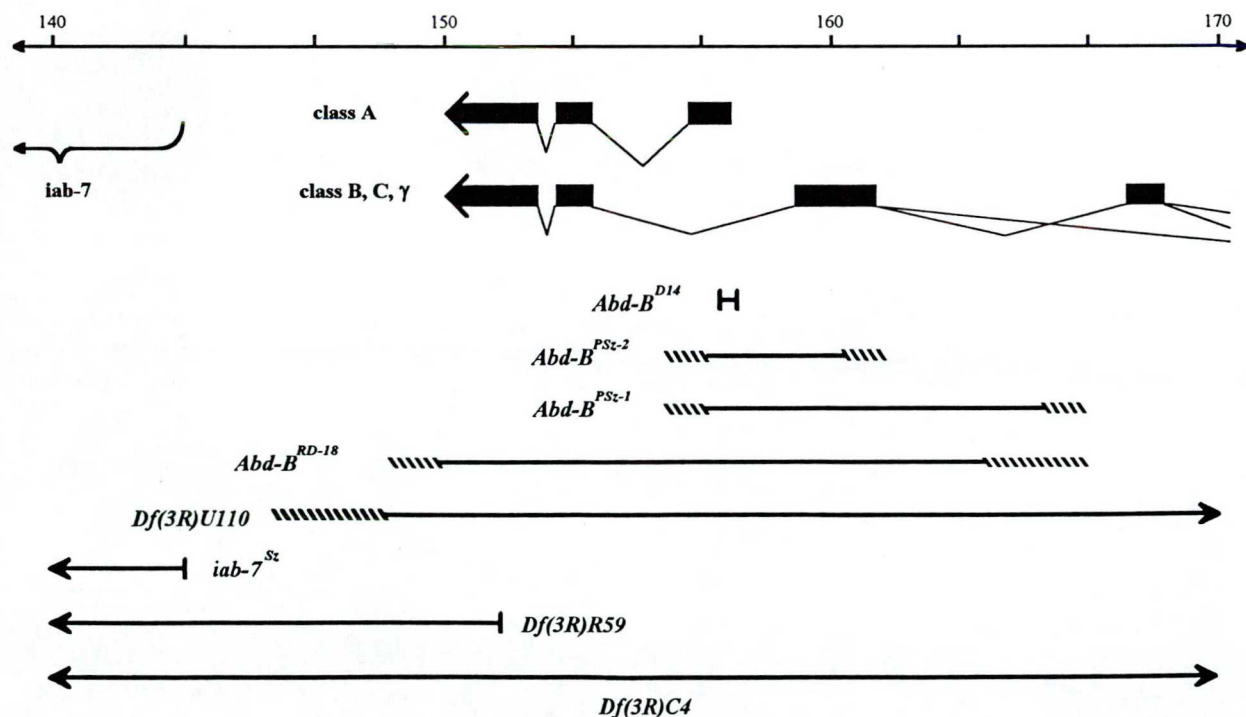
$$Abd-B^{D14} > Abd-B^{PSz2} > Abd-B^{RD18} \geq Abd-B^{PSz1} > Df(3R)U110$$

Igazoltuk, hogy a kapott komplementáció az *iab-7* szabályozó elem jelenlététől függ: nem észlelhető, ha ez a régió hiányzik. Ha például a *Df(3R)C4* és *Df(3R)U110*

deléciókat összehasonlítjuk (12. ábra), megállapítható, hogy mindkét deléció teljesen eltávolítja az *Abd-B* gént. Míg azonban a *Df(3R)U110* proximális töréspontja épen hagyja az *iab-7* régiót, addig a *Df(3R)C4* eltávolítja azt. Ennek megfelelően a *Df(3R)C4iab-7^{Sz}* heterozigóták hatodik és hetedik tergite egyformán nagy (be nem mutatott adat).

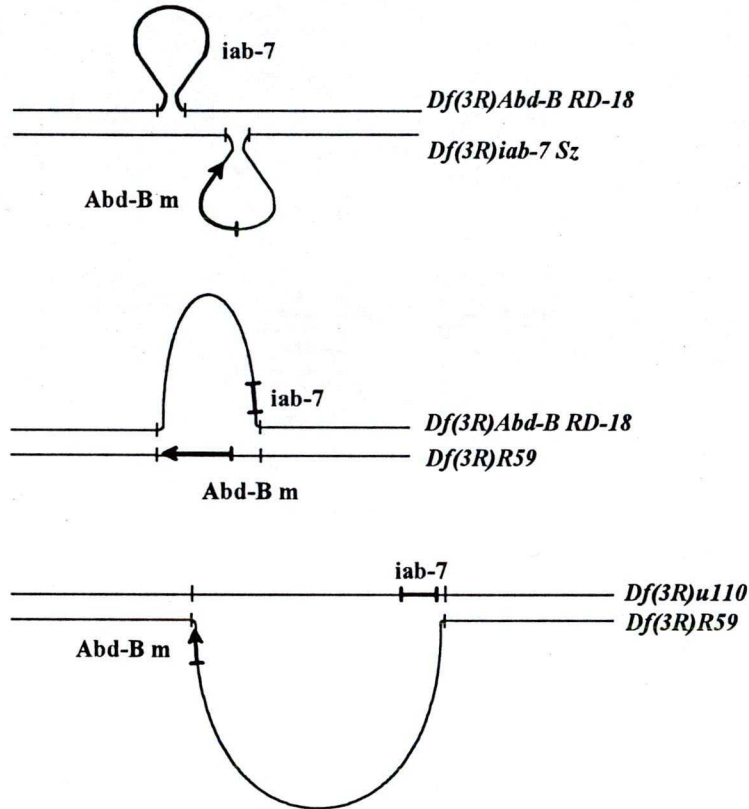
A hetedik tergite méretének csökkenése tehát az *iab-7* régió egyre erősödő mértékű transz-reguláló képességének a következménye. A transz-reguláció növekvő erősségének irányában nő a deléciók mérete is (12. ábra), a *Df(3R)U110* már citológiai is látható.

12. ábra. A komplementációs kísérletben használt deléciók elhelyezkedése a molekuláris térképen. A ferdén sávzott vonalvégek a töréspontok bizonytalanságát jelölik.



A *Df(3R)U110* deléció további érdekessége, hogy a *Df(3R)U110iab-7^{Sz}* heterozigótákban nem egységes a hetedik tergít mérete, még egy egyed esetében sem: eltérő méretű sejtcsoportok - tergít-klónok - figyelhetők meg (be nem mutatott adat, a lehetséges magyarázatot lásd **Eredmények megvitatása** fejezetnél). Amennyiben az előző komplementációs teszthez hasonló keresztezéseket végzünk úgy, hogy az *iab-7^{Sz}* deléció helyett a *Df(3R)R59* deléciót használjuk, akkor - a *Df(3R)U110* kivételével - hasonló sorrendet állíthatunk fel a komplementáció erősségére vonatkozóan. A *Df(3R)U110Df(3R)R59* heterozigótáknál nem tapasztalunk komplementációt, ami nem magyarázható azzal, hogy ez a két deléció átfedi egymást, míg az *iab-7^{Sz}* esetében nem (61. oldal, 12. ábra). Az *Abd-B^{RD18}Df(3R)R59* heterozigótákban ugyanis szintén átfedi egymást a két deléció, mégis hasonló mértékű komplementációt észlelhetünk, mint a nem átfedő, *Abd-B^{RD18}iab-7^{Sz}* mutáns-kombináció esetében. Ha összehasonlítjuk az *Abd-B^{RD18}Df(3R)R59* és *Df(3R)U110Df(3R)R59* heterozigótáknál, hogy hogyan helyezkedik el egymáshoz képest az *iab-7* régió és az *Abd-B* gén 5' vége (következő oldal, 13. ábra), akkor megállapíthatjuk, hogy az első esetben a nem párosodott szakasz két azonos, míg az utóbbi kombinációnál a két ellentétes helyzetű töréspontjánál találhatók. Ez esetben az *iab-7* regulátor elem és az *Abd-B* *m* promóter közötti távolság feltehetőleg nagyobb annál, mint ami a komplementáció révén kimutatható kölcsönhatáshoz szükséges.

13. ábra. Az *Abd-B* gén és az *iab-7* szabályozó régiók elhelyezkedése (vastag vonal) különböző deléció-kombinációk esetében. A függőleges vonalak a töréspontokat, illetve a nem párosodott szakaszok kezdetét-végét jelölik. Az ábra nem részarányos!



Az *iab-7^{Sz}* mutációt komplementáló *Abd-B* allélek molekuláris ismerete révén megállapítható, hogy az *Abd-B^{D14}* kivételével, a többi *Abd-B* allélben a deléciók jóval nagyobb DNS-szakaszokat távolítanak el, mint ami a szigorú értelemben vett *Abd-B m* promóter elem (Zavortnik és Sakonju, 1989) kiejtéséhez lenne szükséges.

A *zeste* funkció vagy redundáns, vagy egyáltalán nem szükséges az *Abd-B* doménben. Mint azt az előzőekben (1.2.1.7. fejezet) leírtam, a *zeste* gén bizonyos alléljei képesek egyes lókuszok esetében a párosodás-függő fenotípusokat módosítani. Egy esettől eltekintve (Martinez-Laborda és mtsai., 1992) a szintén

BX-C-hez tartozó *Ubx* doménben leírt összes párosodás-függő kölcsönhatás egyben *zeste*-függő is. Meglepetésünkre azt tapasztaltuk, hogy az általunk vizsgált fenotípusok egyike sem módosul z^l , z^a , $z^{e(bx)}$, z^{op6} illetve z^{v77h} allélok jelenlétében.

Transzvekción embrionális szövetekben. Megvizsgáltuk, hogy a *Fab-7* mutáció segítségével kimutatható-e az *iab-7* régió transz-reguláló képessége az adult epidermisz sejtjeitől eltérő, egyéb sejtekben is. E célból különböző keresztezésekből származó embriók központi idegrendszerében (CNS) vizsgáltuk az *Abd-B* gén kifejeződési mintázatát immun-hisztokémiai módszerrel. A vad típusú embriókban az ABD-B fehérje mennyisége lépcsőzetes módon emelkedik a tizedik paraszegmenttől (PS10) a PS14-ig (69. oldal, 15/a ábra). A várakozásnak megfelelően, a *Fab-7Abd-B^{D16}* homozigótákban nincs festődés (ez az allél az *m* és *r* funkciókra is null, be nem mutatott adat). Az *Abd-B^{D14}* allélban a deléción a proximális promótert és az *Abd-B m* funkciónak megfelelő transzkriptum (*class A*) iniciációs helyét is eltávolítja (Zavortnik és Sakonju, 1989). Ez alapján csak a PS14-ben várható festődés a homozigóta *Fab-7Abd-B^{D14}* embriókban. Ennek ellenére a PS13-ban gyenge festődést észleltünk (69. oldal, 15/b ábra). (A lehetséges magyarázatot lásd **Eredmények megvitatása.**) A *bithorax-komplex bxd* régiójától az *iab-7* végéig terjedő szakaszt eltávolító *Df(3R)R59*, illetve az *iab-7* régióban inverziós töréspontot (például *iab-7^{MX2}* vagy *iab-7¹⁶⁴*) hordozó homozigótákban a festődés csak a PS13-ban és a PS14-ben észlelhető (69. oldal, 15/c ábra).

Ahogy reméltük, a *Fab-7Abd-B^{D14}IDf(3R)R59* heterozigóták CNS-ében azonos intenzitású festődés látható a PS11-ben és a PS12-ben (69. oldal, 15/d ábra).

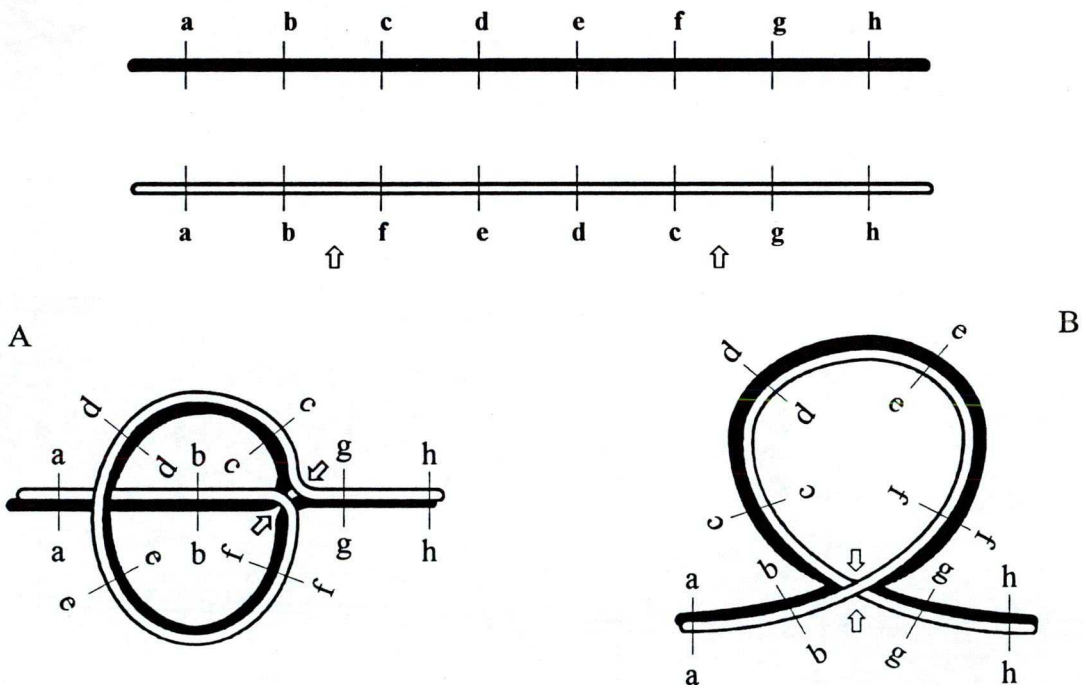
A festődés e két paraszegmentben annak köszönhető, hogy a *Fab-7Abd-B^{D14}* kromoszómán lévő, mindkét paraszegmentben aktív *iab-7* régió transz-regulálja a *Df(3R)R59* mutációt hordozó homológon lévő ép *Abd-B* gént. Meglepő módon, a *Fab-7Abd-B^{D16}IDf(3R)R59* embriókban a *Fab-7Abd-B^{D14}IDf(3R)R59* embriókkal megegyező intenzitású festődést észleltünk a PS11-ben és PS12-ben (be nem mutatott adat). Ez azért váratlan, mert a két *Abd-B* allél eltérő fenotípust okoz a felnőtt egyedeken: a *Fab-7Abd-B^{D14}IDf(3R)R59* heterozigótákkal ellentétben, nem észleltünk *Fab-7* jellegű festődést a *Fab-7Abd-B^{D16}IDf(3R)R59* heterozigótákon. A CNS-ben észlelt festődéssel szemben, egyik *Abd-B* allél esetében sem látható festődés a PS11 és PS12 ektodermális és mezodermális részében az embrionális egyedfejlődés ún. „germ-band retraction” kezdeti állapotában, holott a vad típusú embriókban épp ebben a stádiumban tanulmányozható legjobban ezekben a szelvényekben az *Abd-B* gén expressziója (be nem mutatott adat).

Mindkét *Abd-B* allél esetében igen gyenge festődést észleltünk a CNS-ben a PS9-ben (69. oldal, 15/d ábra). Ez felvetette a lehetőségét annak, hogy az *iab-7* mellett, az *iab-5* és *iab-6* régiók is képesek transz-regulációra. Hogy ezt ellenőrizzük, megfestettük az *Mcp^{B116}iab-7^{Sz}Abd-B^{D16}IDf(3R)R59* embriók CNS-ét. Ebben a genotípusban az *Mcp* mutáció következtében az *iab-5* régió a PS9-ben és PS10-ben, míg az *iab-7* hiánya miatt az *iab-6* régió a PS11-ben és PS12-ben szabályozhatná a transz-helyzetű, ép *Abd-B* gént. A megfelelő genotípusú embriók CNS-ében gyenge, azonos szintű festődést észleltünk a PS11-ben és a PS12-ben, ettől még gyengébb, de szintén azonos intenzitásút a PS9-ben és a PS10-ben (69. oldal, 15/e ábra).

A transz-reguláció az embrionális CNS-ben kevésbé érzékeny a párosodás gátlására, mint az adult epidermiszben. Azt tapasztaltuk, hogy egyszerűbb átrendeződések, melyek az adult epidermiszben erősen gátolják a homológok kromoszómák párosodását (*iab-7^{MX2}*, *TSR-59A*) a CNS-ben látszólag nem csökkentik a festődést a PS11-ben és a PS12-ben (például a *TSR-59A, Fab-7Abd-B^{D16}IDf(3R)R59* és *Fab-7Abd-B^{D16}IDf(3R)R59* embriókban azonosnak látszik a festődés intenzitása, be nem mutatott adat). Ezzel szemben a *Fab-7Abd-B^{D16}iab-7¹⁶⁴* embriókban gyenge és szabálytalan a festődés ebben a két paraszegmentben, ami azzal magyarázható, hogy a többszörös átrendeződést hordozó *iab-7¹⁶⁴* kromoszóma ebben a szövetben is jelentősen gyengíti a homológok párosodását (69. oldal, 15/f ábra). Ezek után megvizsgáltuk az egyszerű átrendeződést (paracentrikus inverziót) hordozó, *In(3R)Fab-7iab-7^{RS}* homozigóta és *In(3R)Fab-7iab-7^{RS}IDf(3R)P9* hemizigóta embriók CNS-ében az *Abd-B* gén expressziós mintázatát. (Az *iab-7^{RS}* mutációt a *Fab-7* fenotípus reverziója alapján izoláltuk, az inverzió töréspontjai a 87C1-C2,3 illetve a 89 E3,4 citológiai régióban vannak (Gyurkovics, nem közölt adat). Mivel az inverzió töréspontja a *BX-C*-ben az *iab-7* régió és az *Abd-B* gén közötti területre esik, feltételeztük, hogy az inverzió csupán elválasztja e két egységet, de funkcionálisan érintetlenül hagyja őket.) Míg az *In(3R)Fab-7iab-7^{RS}* homozigótákban csak a PS13-ban és PS14-ben láttunk festődést (hasonlóan más, az *iab-7* régióban töréspontot hordozó mutációhoz, lásd például *Df(3R)R59* homozigóta, 69. oldal, 15/c ábra), addig az *In(3R)Fab-7iab-7^{RS}IDf(3R)P9* hemizigótákban azonos intenzitású, gyenge festődést tapasztaltunk a PS11-ben és

a PS12-ben (69. oldal, 15/g ábra). Az $In(3R)Fab-7iab-7^{RS}IDf(3R)P9$ hemizigótákban - a homológ kromoszómával való párosodás következtében kialakuló inverziós hurok révén - az átrendeződés töréspontjai (amelyek egymástól megabázisnyi, illetve két számított, citológia egységnyi távolságra vannak) oly közel kerülnek egymáshoz (14/a-b ábra), hogy az *iab-7* képes szabályozni a tőle ily messzire került, de azonos kromoszómán lévő *Abd-B* gént.

14. ábra. Az inverziós hurok az inverzióra heterozigóta egyedekben (A) „felülnézetben”, (B) „oldalnézetben”. A nyilak a töréspontokat jelölik.

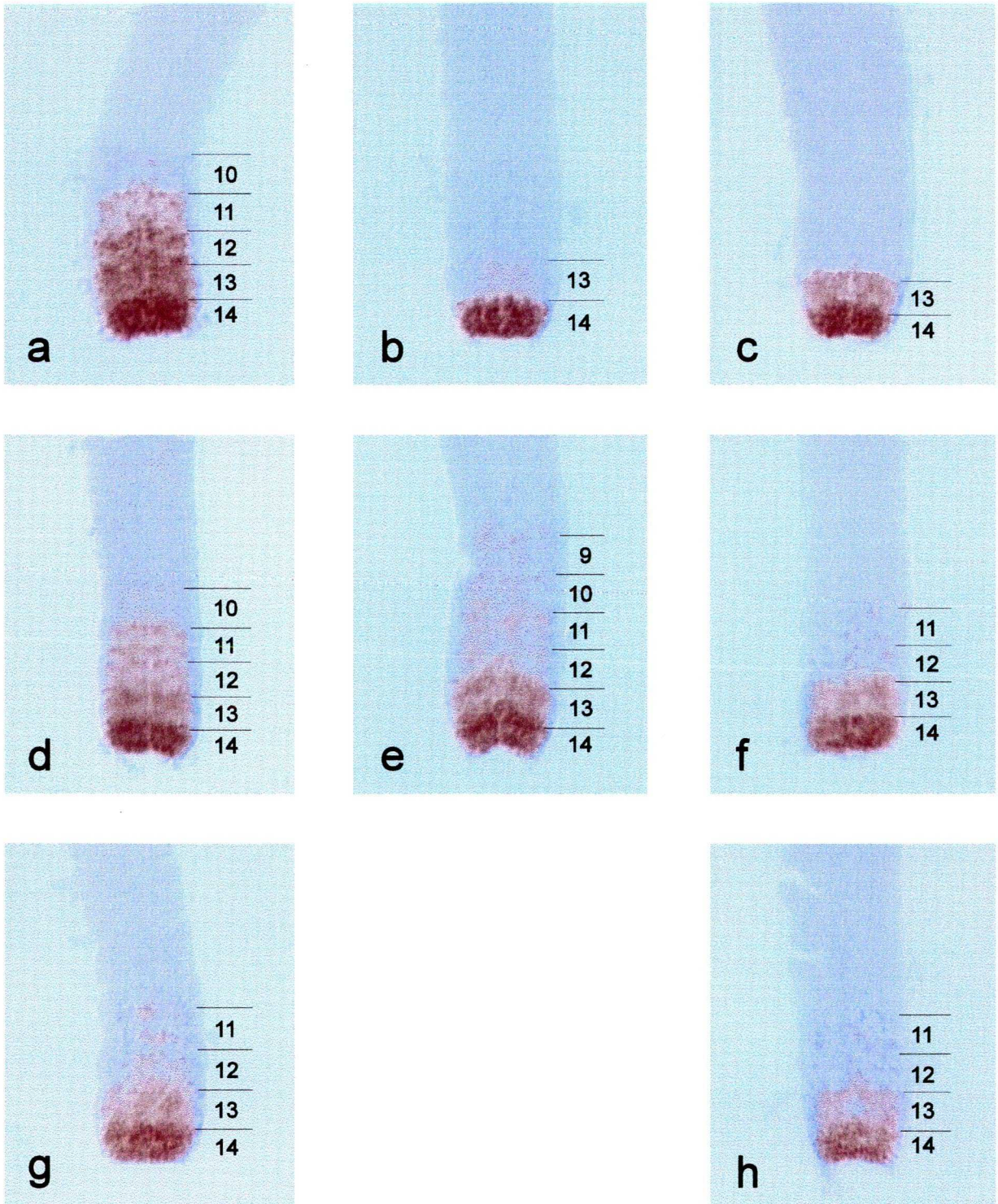


Ez a kölcsönhatás nem jöhet létre, ha az inverzió homozigóta formában van jelen, mert ilyenkor nem alakul ki hurok, a kromoszómák a vad típushoz hasonlóan párosodnak egymással. Az $In(3R)Fab-7iab-7^{RS}IDf(3R)P9$ embriókban kapott festődés igazolta elképzelésünket, miszerint az *iab-7* regulátor régió és az *Abd-B* gén is ép és működőképes az $In(3R)Fab-7iab-7^{RS}$ kromoszómán.

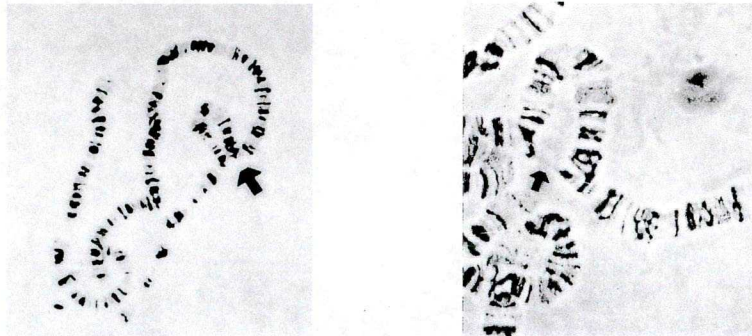
Transz-reguláción alapuló, párosodástól független kölcsönhatás?

Megvizsgáltuk az *In(3R)Fab-7iab-7^{RS}* átrendeződéshez igen hasonló (közeli töréspontú, 87D1,2; 89E3,4) *In(3R)Fab-7iab-7^{R7}* (Gyurkovics és mtsai.,1990) átrendeződés esetében is az *Abd-B* gén expressziós mintázatát a CNS-ben. A homozigóta *In(3R)Fab-7iab-7^{R7}* illetve hemizigóta *In(3R)Fab-7iab-7^{R7}IDf(3R)P9* embriókban is csak a PS13-ban és PS14-ben van festődés, vagyis ebben a mutánsban az *iab-7* régió működésképtelen (be nem mutatott adat). A homozigóta *In(3R)Fab-7iab-7^{R7}* illetve a homozigóta *In(3R)Fab-7iab-7^{RS}* embriókkal ellentétben, a heterozigóta *In(3R)Fab-7iab-7^{RS}||In(3R)Fab-7iab-7^{R7}* embriókban a PS11-ben és a PS12-ben is gyenge, szabálytalan mintázatú festődést észleltünk (69. oldal, 15/h ábra), ami azzal magyarázható, hogy az *In(3R)Fab-7iab-7^{RS}* kromoszómán lévő funkcióképes *iab-7* szabályozza a saját kromoszómáján illetve az *In(3R)Fab-7iab-7^{R7}* mutációt hordozó homológon lévő *Abd-B* gént. Ez az eredmény igen meglepő, hiszen a két hasonló töréspontú átrendeződés miatt nem jöhetne létre a heterozigóták esetében jól megfigyelhető inverziós hurok, ami révén közel kerülhetne egymáshoz az *iab-7* régió és az *Abd-B* gén. Elméletileg a két töréspont környezetében csupán a 87C-től a 87D-ig terjedő citológiai egység nem párosodik, a kromoszóma többi része - eltekintve attól, hogy mindkét kromoszómán fordított orientációjú a 87D és 89E régiók közötti szakasz - normális. A citológiai vizsgálat ennek ellenére feltárta, hogy a két kisméretű, kihurkolódó 87C kromoszóma-szakasz nagy gyakorisággal (közel 50%) párosodik egymással, melynek következtében az inverziós hurokhoz hasonló szerkezetet figyelhetünk meg (70. oldal, 16. ábra).

15. ábra. *Drosophila*-embriók központi idegrendszere (CNS) *Abd-B* ellenanyaggal festve. (a) $+/+$, (b) *Fab-7Abd-B^{D14}* homozigóta, (c) *Df(3R)R59* homozigóta, (d) *Fab-7Abd-B^{D16}Df(3R)R59*, (e) *Mcp^{B116}iab-7^{Sz}Abd-B^{D16}Df(3R)R59*, (f) *Fab-7Abd-B^{D16}iab-7¹⁶⁴*, (g) *Fab-7iab-7^{R5}Df(3R)P9*, (h) *In(3R)Fab-7iab-7^{R5}In(3R)Fab-7iab-7^{R7}*



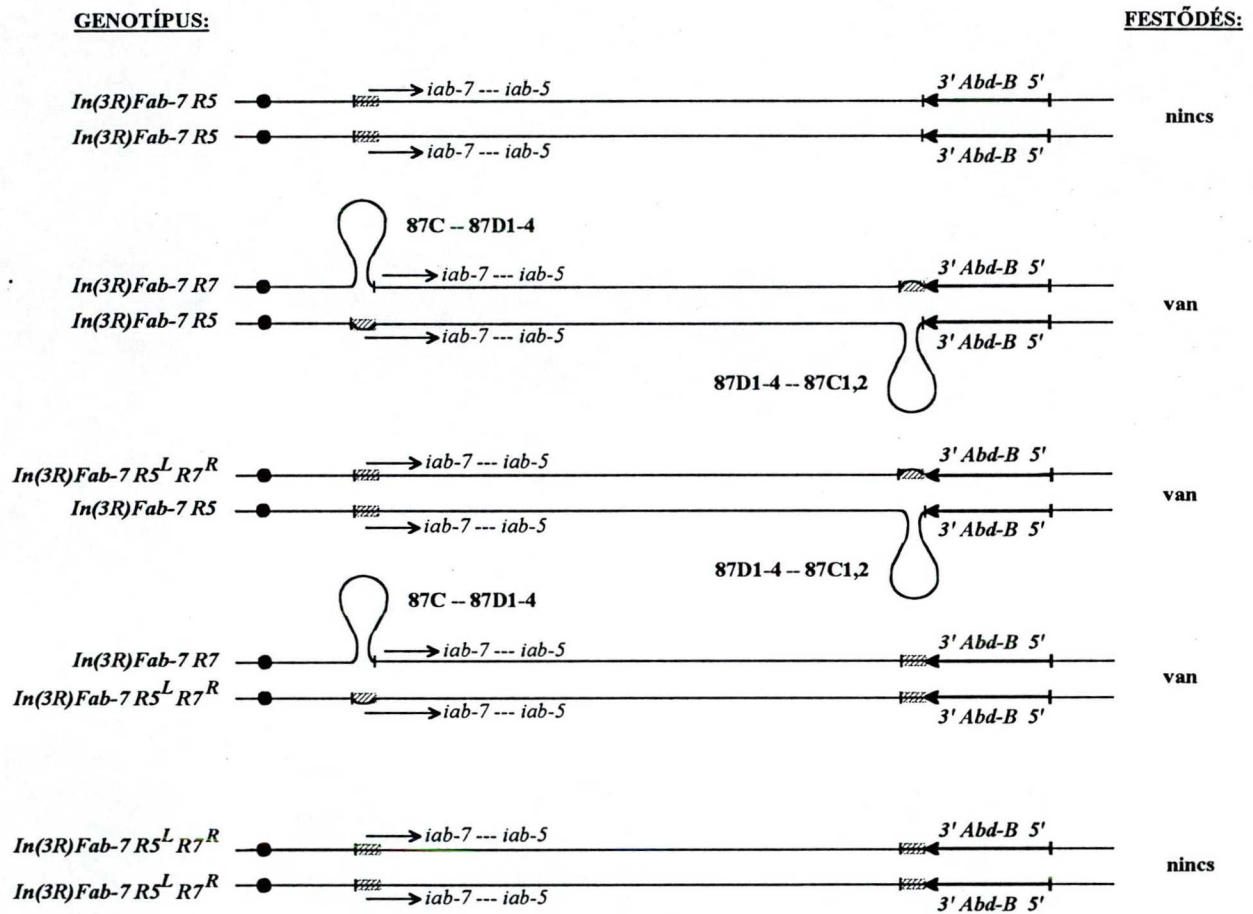
16. ábra. Nyálmirigy-óriáskromoszóma készítmények $In(3R)Fab-7iab-7^{R5} | In(3R)Fab-7iab-7^{R7}$ lárvákból. A nyíl a kihurkolódó 87C régiók közötti kapcsolatra mutat. Fáziskontraszt mikroszkóp, 500x illetve 1200x nagyítás.



Feltételeztük, hogy a 87C régiók párosodása révén kerül az *iab-7* régió és az *Abd-B* gén közel egymáshoz, és ezáltal jön létre a transz-reguláció a CNS-ben. Hogy ezt ellenőrizzük, rekombináció segítségével létrehoztunk egy olyan inverziót hordozó kromoszómát, melynek proximális (bal oldali, *L*) töréspontja az $In(3R)Fab-7iab-7^{R5}$, míg a disztális (jobb oldali, *R*) töréspontja az $In(3R)Fab-7iab-7^{R7}$ kromoszómából származik (lásd **Anyagok és módszerek**). Az így kapott kromoszómából hiányzik az eddig kihurkolódott 87C-től a 87D-ig terjedő régió, viszont kétszer is tartalmazza (az átrendezés töréspontjainál) azt a körülbelül tíz kilobázisnyi szakaszt, ami eredetileg az *Abd-B* gén 3' vége felé, az $In(3R)Fab-7iab-7^{R7}$ és $In(3R)Fab-7iab-7^{R5}$ inverziók töréspontjai között található. Mint az a **17. ábrán** (**72. oldal**) látható, a rekombináns és a szülői kromoszómák között nincsenek nem párosodott, homológ szakaszok, vagyis nem várható az *R5/R7* kombinációhoz hasonló kapcsolat a kihurkolódó, homológ régiók között. Ezt a feltevést a citológiai vizsgálat is megerősítette az $In(3R)Fab-7iab-7^{R5} | In(3R)Fab-7R5^L R7^R$ genotípusú lárvák esetében (be nem mutatott adat). Az $In(3R)Fab-7iab-7^{R7}$ mutációval ezt nem tudtuk ellenőrizni,

mivel az $In(3R)Fab-7iab-7^{R7}In(3R)Fab-7R5^L R7^R$ genotípusú transz-heterozigóták elpusztulnak a harmadik lárvastádium elérése előtt, hasonlóan az $In(3R)Fab-7iab-7^{R7}$ homozigótákhoz. Ennek ellenére a CNS-ben az $R5IR7$ kombinációhoz hasonló festődés észlelhető $R5^L R7^R IR5$ és $R5^L R7^R IR7$ embriókban egyaránt (be nem mutatott adat). Ez az eredmény nem magyarázható egyszerűen azzal, hogy a $BX-C$ -ben egy kisméretű (kb. tíz kilobázis hosszú) szakasz a rekombináns kromoszómán két példányban van jelen, hiszen a homozigóta $In(3R)Fab-7R5^L R7^R$ embriókban (a $Fab-7iab-7^{R5}$ illetve $Fab-7iab-7^{R7}$ inverziókra homozigóta embriókhoz hasonlóan) csak a PS13-ban és PS14-ben van festődés (be nem mutatott adat). Feltételezzük, hogy a CNS-ben az $iab-7$ régió és az $Abd-B$ gén a transz-regulációhoz szükséges közelségbe kerül egymással annak ellenére, hogy a nyálmirigy-sejtekben nem látunk közöttük párosodást (lehetséges magyarázatot lásd az **Eredmények megvitatása** fejezetben). A transz-regulációhoz szükséges közelség biztosításában nagy valószínűséggel a rekombináns kromoszómán kétszer is jelen lévő, tíz kilobázis körüli méretű DNS-szakasz játszik döntő szerepet azáltal, hogy megtalálja és kölcsönhatásba lép a homológ szakaszával a másik töréspont környezetében. Úgy tűnik, hogy ez a kölcsönhatás nem jön létre akkor, ha ez a szakasz a homológ kromoszómán azonos pozícióban (párosodva) van jelen, mint például a homozigóta $In(3R)Fab-7iab-7^{R5}$ illetve $In(3R)Fab-7R5^L R7^R$ embriók esetében (17. ábra, következő oldal).

17. ábra. Az inverziókat hordozó két szülői, az R5 és R7, valamint a rekombináns kromoszóma szerkezete. A ferdén sávozott rész az említett tíz kb hosszú DNS-szakasz helyzetét jelzi. Továbbá fel van tüntetve, hogy a különböző genotípusokban látható-e festődés a PS11-ben és a PS12-ben.



4. AZ EREDMÉNYEK MEGVITATÁSA

Az ecetmuslicában az A4-től hátrébb elhelyezkedő potrohszelvények identitását - ezáltal a *Fab-7* fenotípus mértékét is - az *Abd-B* géntermék szelvényenkénti, aktuális szintje határozza meg. A normálisnál minél magasabb ez a szint a hatodik potrohszelvényben, annál inkább az A7-re fog hasonlítani az A6. Például a *Fab-7I+* hetero- és *Fab-7IDf(3R)P9* hemizigóták A6-jában az *Abd-B* géntermék szintje a vad A6 és A7 közötti szintre emelkedik, amit hímekben a hatodik tergít erősen lecsökkent mérete jelez. A *Fab-7* homozigóták A6-ja már teljesen A7-té módosult, ezért a hímeken egyáltalán nem látható hatodik tergít.

A *Fab-7IDf(3R)P9* hemizigótához hasonlóan egy *Fab-7IAbd-B* transz-heterozigótában is csak egy kópia működőképes *Abd-B* gén van jelen, ezért hasonló mennyiségű génterméket - azonos fenotípust - várnánk e két genotípusban. Ennek ellenére a *Fab-7IAbd-B^{D16}* heterozigóták hatodik potrohszelvénye jelentősen nagyobb (a *Fab-7* fenotípus szuppresszált) a *Fab-7IDf(3R)P9* hemizigóták hatodik potrohszelvényéhez képest, míg a hetedik tergitek mérete megegyezik a két genotípusban. Elképzelhető lenne, hogy a szuppresszió az oka, hogy a mutáns *Abd-B* génről ún. „antimorf” géntermék képződik, ami (például dimer formájú ABD-B fehérje esetében) „mérgezi”, működésképtelenné teszi a vad típusú génterméket, csökkentve ezáltal a működőképes géntermék mennyiségét. Ez ellen szól, hogy ez a hatás csak a hatodik potrohszelvényben jelentkezik, míg a hetedikben nem. Továbbá, az összes vizsgált *Abd-B* pontmutáció hasonlóan

viselkedik. Talán legmeggyőzőbb ellenérv az antimorf hatás ellen az, hogy a szuppresszió mértéke nem csökken, ha egy extra *BX-C* kópiát (*Tp(3;1)bx^{d11}* illetve *Tp(3;1)P115*) viszünk be a *Fab-7/Abd-B^{D16}* transz-heterozigótákba. Ezzel szemben teljesen megszűnik, ha kromoszómális átrendeződéseket indukálunk az egyik homológon a *BX-C* és a centromer közötti szakaszon. Tehát a *Fab-7* fenotípus transz-szuppressziója a homológ kromoszómák párosodásától függ, vagyis a transzvekción egy esete az *Abd-B* doménon belül.

Eredményeink alapján a szuppresszió annak a következménye, hogy az *iab-7* szabályozó elem aktiváló képessége korlátozott, ami megoszlik a két párosodó *Abd-B* gén között azokban a szelvényekben, melyekben csak egy aktív állapotú *iab-7* régió található. Az *iab-7* szabályozó elem aktiváló hatásának megoszlása kétféle módon is elképzelhető: a fizikai értelemben vett megoszlása mellett az is lehetséges, hogy ez a hatás időben oszlik meg a két párosodó *Abd-B* gén között, melyek versengenek egymással az *iab-7* régióval való kölcsönhatásért. Maga a megoszlás ténye még nem okoz szuppressziót, hiszen a *Fab-7I+* heterozigóta (van megoszlás) és a *Fab-7IDf(3R)P9* hemizigóta (nincs megoszlás) hímek hatodik potrohszelvénye hasonló méretű. Látható, hogy a fenotípus szempontjából csak az *Abd-B* RNS illetve fehérje össz mennyisége a fontos, az nem számít, hogy a géntermék egy vagy két génről származik. Ha azonban a jelenlévő és párosodó transz-helyzetű gén null-mutációt hordoz, nem képződik róla fehérje, ezáltal elvesz, elfecsérelődik az *iab-7* elemnek az erre a génre jutó aktivitása, végeredményben lecsökken az *Abd-B* géntermék szintje, a *Fab-7* fenotípus visszaszorul. A

szuppresszió okának másik lehetséges magyarázatát (az aktív és inaktív állapotú *iab-7* régiók kölcsönhatása) kizárhatjuk, mivel a szuppresszió akkor is megfigyelhető, ha az A6-ban nincs jelen, hiányzik a párosodó, inaktív *iab-7* szabályozó elem.

A szuppresszió nemcsak azáltal szüntethető meg, ha gátoljuk a homológ kromoszómák párosodását, hanem akkor sem észlelhető, ha az adott szelvényben két párosodó, aktív *iab-7* régió van. Ez is kétféleképpen magyarázható: az első esetben nem alakul ki megoszlás, mindkét *iab-7* a „saját” (cisz-helyzetű) *Abd-B* génjét szabályozza. A másik lehetőség szerint viszont mindkét *iab-7* szabályozza mindkét *Abd-B* gént (kettős cisz- és transz-reguláció), de mivel az így elvesztett-visszakapott aktiváló hatás mértéke egyforma, nem észlelünk szuppressziót. A hiperaktiváció révén láthattuk, hogy az *Abd-B* gén promótere nem „telített”, mindkét *iab-7* régió képes szabályozni (ha nem is azonos mértékben) egyszerre. Ez azonban csak akkor mutatható ki, ha az egyik szabályozó elemmel cisz-helyzetű promóter-régió legalább részlegesen hiányzik. Noha nincs egyértelmű bizonyítékunk az első magyarázat helyes voltára, mégis úgy gondoljuk, hogy az a valószínűbb: feltehetőleg kevésbé „akar” elszakadni (akárcsak részlegesen illetve ideiglenesen) egy szabályozó elem a saját, cisz-helyzetű promóterétől akkor, ha a párosodó homológon lévő, transz-helyzetű promóter már egy azonos erősségű saját, cisz-regulátor elemmel létesített kapcsolatot. Az emberi kapcsolatok világából kölcsönzött szavakkal élve, a cisz-helyzetű promóter irányában „elkötelezett” szabályozó régió számára valószínűleg kevésbé „csábító” egy „foglalt”, transz-helyzetű promóter, mint egy „szabad”...

A nagytávolságú génszabályozás egyik lehetséges mechanizmusa, az ún. „looping-model” szerint az enhanszer és a promóter régió fizikai kapcsolatot létesít egymással, miközben a közöttük lévő DNS-szakasz kihurkolódik. Kísérleti eredményeink alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy az *Abd-B* gén esetében a proximális promótortól „upstream” elhelyezkedő DNS-szakasz fontos szerepet tölt be az enhanszer hatású szabályozó régiók rögzítésében, a kihurkolódott állapot kialakításában illetve fenntartásában. Érdekes módon úgy tűnik, hogy ez a kölcsönhatás transzkripció nélkül is létrejön és fennmarad. A null allél *Abd-B^{DI4}* esetében a mutációt előidéző deléció eltávolít egy 411 bp méretű szakaszt, melyből 345 bp „downstream” és 66 bp „upstream” helyezkedik el a transzkripció iniciációs helyéhez (class A) viszonyítva (*Zavortnik és Sakonju, 1989*). Ennek következtében meggyengül az akár cisz-, akár transz-helyzetű *iab-7* régió és a deléciót hordozó *Abd-B* gén között a kapcsolat. Ugyanakkor az *Abd-B^{DI4}* allél még mindig képes bizonyos mértékig versengeni a transz-helyzetű *Abd-B* génnel az *iab-7* régióval való kapcsolatért (lásd *Abd-B^{DI4}/Fab-7* illetve *Abd-B^{DI4}/TSR-Sz-1, Fab-7* heterozigóták A6-jának összehasonlítása, **58.** oldal, **10.** ábra). Ez a megfigyelés felveti annak a lehetőségét, hogy a szűk értelemben vett promóter funkció és az enhanszert a gén 5' végéhez rögzítő mechanizmus fizikailag is elkülöníthető egymástól. Ezt alátámasztja, hogy a P elem inszerció okozta hipomorf *UC21-10* és *UC21-10,1-d* *Abd-B* allélok is (az *Abd-B* gén 5' végét eltávolító *Abd-B^{DI4}* allélhoz hasonlóan) gyengébb kölcsönhatást létesítenek az *iab-7* régióval, mint egy struktúrálisan ép *Abd-B* gén (lásd **Eredmények**). Mindkét inszerció 253 bázispárral „upstream”

helyezkedik el a proximális *Abd-B* promóterről származó *class A* RNS transzkripció-iniciációs helyéhez képest (McCall és mtsai., 1994). A homozigóta *UC21-10* vagy *UC21-10,1-d* embriókban az *ABD-B m* fehérje mennyisége lecsökken ugyan a vad típusú embriókhoz képest, de nem tűnik el teljesen, jelezve, hogy a promóter régió működőképes (McCall és mtsai., 1994). Valószínű, hogy a több tíz kilobázis méretű inszerciók csupán elválasztják egymástól a promótert és az *iab-7* elem rögzítésében résztvevő DNS-szakaszt, ezzel magyarázható a maradék gyenge *Abd-B* aktivitás és az *iab-7* régióval létesített kapcsolat meggyengülése.

Bár az *Abd-B* gén esetében molekuláris kísérletekkel nem határozták meg a minimálisan szükséges promóter régiót, a fenti eredmények alapján valószínűsíthető, hogy upstream irányban nem terjedhet 250 bázispárnál sokkal messzebbre. Ezzel összhangban, az *Ubx* gén esetében 680 bp elegendőnek bizonyult a promóter funkció ellátására (Saari és Bienz, 1987). Ugyanakkor az *Abd-B* gén és az *iab-7* elem közötti kölcsönhatás akkor sem szűnik meg teljesen, ha az upstream régió további részei (2,1 illetve 7,6 kb) hiányoznak, de a kapcsolat annál inkább gyengül, minél nagyobb az *Abd-B* gén 5' végét eltávolító deléción mérete. Ez az összefüggés azt sugallja, hogy a szabályozó régiók rögzítéséért felelős DNS-szakasz elemekre bontható, amelyek több kilobázisnyi területen helyezkednek el.

Mások (Boulet és mtsai., 1991; Celniker és mtsai., 1990) eredményeitől eltérően azt tapasztaltuk, hogy a homozigóta *Abd-B^{D14}* embriók CNS-ében kismennyiségű *ABD-B* fehérje mutatható ki a PS13-ban (69. oldal, 15/b ábra). Az *Abd-B^{D14}* allél a genetikai kísérletekben azonban nem hipomorf, hanem null allélnak

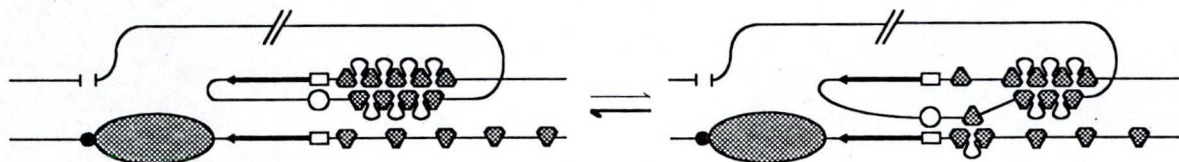
bizonyult az *m* funkcióra nézve. E mellett, a mutáció molekuláris természete (66 bp upstream, 345 bp downstream hiányzik a *class A* transzkriptum iniciációs helyéhez képest, *Zavortnik* és *Sakonju*, 1989) miatt is valószínűtlen, hogy a PS13-ban kapott festődés az ABD-B *m* fehérje jelenlétének lenne köszönhető. Az általunk használt ellenanyag (1A2E9, monoklonális egér-anti-ABD-B, *Celniker* és *mtsai.*, 1989) mind a négy *Abd-B* transzkriptumról készülő fehérjét felismeri a közös 3' végi exonok miatt (61. oldal, 12. ábra). Feltételezzük, hogy az *Abd-B^{D14}* allélban a proximális promóter (részleges vagy teljes) hiánya miatt az így felszabaduló, közvetlenül szomszédos, működőképes *iab-8* cisz-regulátor képes lesz kölcsönhatásba lépni a többi *Abd-B* promóterrel, melyekkel normálisan az *iab-9* régió létesít kapcsolatot a PS14-ben. A proximális *Abd-B* promótert szintén eltávolító *Abd-B^{PSz1}* és *Abd-B^{PSz2}* alléljainkban csak a PS14-ben észlelhető festődés (be nem mutatott adat). Valószínű, hogy e két mutánsban az *iab-8* régió is részleges deléciót szenvedett, ugyanis mindkettőben lényegesen nagyobb (7,6 illetve 2,3 kb) upstream helyzetű DNS-szakasz hiányzik, mint az *Abd-B^{D14}* allél (66 bp, *Zavortnik* és *Sakonju*, 1989) esetében.

A „cisz-transz teszt” segítségével kimutattuk, hogy az *iab-7* régió korlátozott aktiváló hatása egyenlőtlenül oszlik meg a cisz- és transz-helyzetű *Abd-B* gének között, a cisz-helyzetűre nagyobb hányad jut. A legegyszerűbb magyarázat szerint az egyenlőtlen eloszlásnak térbeli oka van: a cisz-helyzetű promóter van közelebb. Az *iab-7* régió és a proximális *Abd-B* promóter azonban igen messze (legalább 20 kilobázis) van egymástól. Joggal merül fel ezek után a kérdés, hogy ilyen nagy távolság esetén számít-e még egy minimális különbség. Ha nem, akkor egyenlő

valószínűséggel alakulna ki cisz- illetve transz-kölcsönhatás. Mivel ez nem így van, egy másik, bonyolultabb magyarázatot tétéleztünk fel, ami időbeli eltérése és energetikai alapokon nyugszik.

Mint az kiderült a hiszton gének esetében (*Hiraoka és mtsai.*, 1993), az egyedfejlődés során a homológ kromoszómák párosodása csak azután következik be, hogy a zigótikus gének aktívvá váltak. A két esemény közötti időbeli eltérés tétélezhető fel az *Ubx* domén esetében is (*Martinez-Laborda és mtsai.*, 1992). Saját eredményeink szerint, az egyedfejlődés „germ-band retraction” állapotáig nem észlelhető transz-reguláció az *Abd-B* doménben, ami szintén a párosodás kezdeti hiányára utal. Ezek szerint amikor kialakul az enhanszer (szabályozó régió) és a promóter között a kapcsolat, az enhanszer nem választhat a cisz- illetve transz-helyzetű promóter között, mert a homológ kromoszómák ekkor még nem párosodtak, ezért csak a cisz-helyzetű promóter elérhető. A későbbiekben, a párosodás kialakulása után az enhanszer „faképnél hagyhatná” a cisz-helyzetű gént és „átpártolhatna” a transz-helyzetűhöz. Ezzel szemben úgy tűnik, hogy valami meggátolja a cisz-kapcsolat felbomlását. Ez azonban nem zárja ki annak lehetőségét, hogy a párosodás létrejötte után egy dinamikus egyensúlyi állapot alakuljon ki minden sejtben a teljesen cisz-helyzetű és a nagyrészt továbbra is cisz-helyzetű, de egyszersmind részlegesen transz-helyzetűvé is átépült rögzítő komplex között (lásd következő oldal, 18. ábra).

18. ábra. A cisz-helyzetű rögzítő komplex részleges átépülését szemléltető dinamikus modell. A folytonos vonal a homológ kromoszómákat és az aktív állapotú szabályozó elemeket (*iab-6* és *iab-7*) jelzi, kitöltött ovális alak az inaktív állapotú *iab-7* elemet, a fekete kör a *Fab-7* izolátor szakasz meglétét, függőleges vonal hiányát jelöli, négyzet a promotert, üres kör az enhanszert, vastag nyíl az *Abd-B* transzkripciót jelöli, a háromszögek pedig a kapcsolat kialakításában szerepet játszó fehérjeegységeket jelzi.

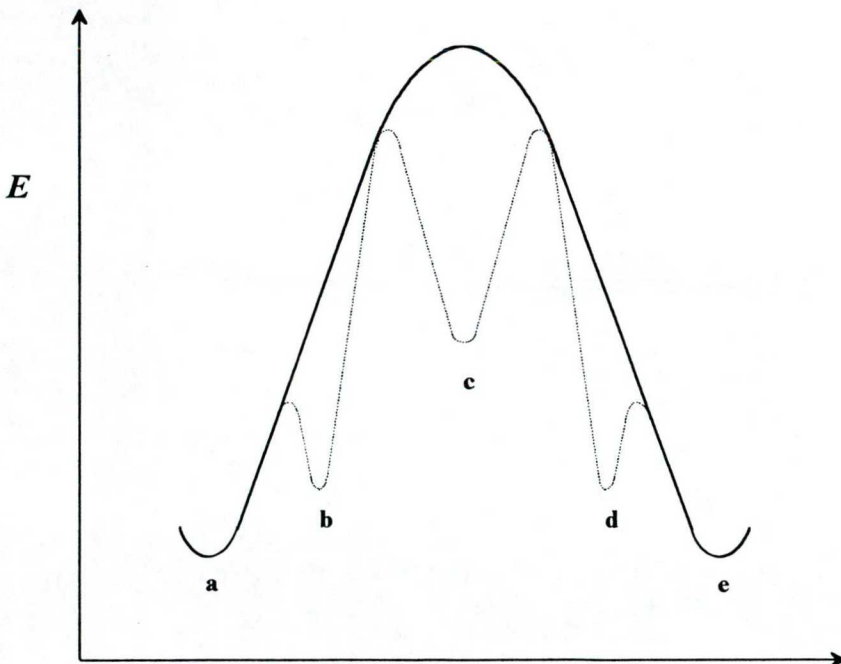


Ha az egyensúly nem alakulna ki minden sejtben, akkor az adott szövetben egy meghatározott arányban, de ezen belül sejtenként (vagy sejt-klónonként) véletlenszerűen fordulnának elő a teljesen cisz- (ezen sejtek lennének túlsúlyban) és a részleges cisz- és transz-helyzetű rögzítő komplexek. Mivel az adult epidermiszen illetve az embrionális CNS-ben látható jellegek az esetek többségében nem klonális jellegűek (a kivételeket lásd később), egy „kiegyenlítő mechanizmusnak” kellene létezni, ami összegezná a sejtenkénti állapotokat és átlagolná a kapott eredményt szöveti szintre. Erre azonban semmilyen adat nem utal az eddig ismert transzvektációs rendszerekben, sőt a kivételesen előforduló klonális jellegek éppen e mechanizmus létét cáfolják.

Véleményünk szerint energetikai okok is gátat szabhatnak egy cisz-helyzetű rögzítő komplex felbomlásának és teljes mértékben transz-helyzetű kapcsolattá való átépülésének. Mint azt megállapítottuk, a szabályozó elemek rögzítéséért felelős upstream régió több kilobázis hosszú, méretétől függ a cisz-kapcsolat erőssége. Ez alapján a rögzítő komplex sok elemből állhat, melyek mind résztvesznek és együttműködnek a maximális erősségű cisz-kapcsolat kialakításában és

fenntartásában. Ha ez a kapcsolat egyszer már kialakult, a rögzítő komplex természete garantálja stabilitását akkor is, ha a homológ kromoszómán lévő szabad *Abd-B* gén kellően megközelíti a cisz-komplexet. A stabilitás oka az lehet, hogy a cisz-helyzetű rögzítő komplex felbontása és transz-helyzetűvé való átépülése csak elemenként történhet. Energetikai alapon, minden egyes újabb elem esetében nagyobb a valószínűsége annak, hogy visszaáll az eredeti, cisz-helyzetű kapcsolat, mintsem egy újabb elem csatlakozzon a kiépülő félben lévő transz-helyzetű komplexhez. Ezáltal rendkívül szilárd lehet a cisz-helyzetű rögzítő komplex, melynek teljes felbontása túl sok energiát igényelne egyszerre. Kismértékű, részleges „átépítése” azonban lehetséges (19. ábra).

19. ábra. Energia-diagramm a teljesen cisz-helyzetű rögzítő komplex átépüléséről teljesen transz-helyzetűvé. (a) teljesen cisz-komplex, (b) nagyrészt cisz-, kismértékű transz-, (c) fele cisz-, fele transz-, (d) nagyrészt transz-, kismértékű cisz-, és (e) teljesen transz-komplex

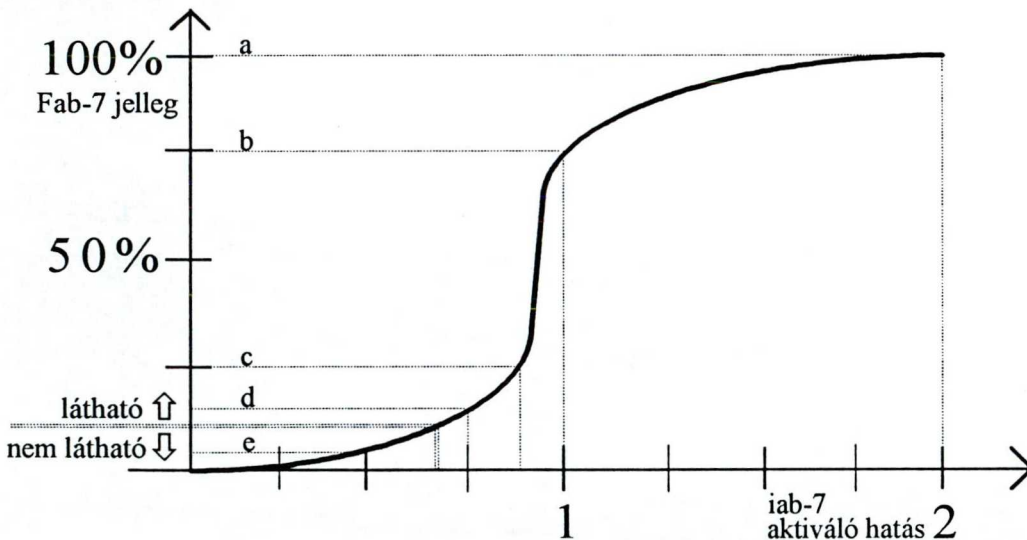


Jelenleg nincs olyan deléció az *Abd-B* doménben, mely teljesen megszüntetné a cisz-helyzetű szabályozó régiók kötődését, de ugyanakkor ne távolítana el a szükségesnél nagyobb méretű kromoszóma-szakaszt is, csökkentve ezáltal a homológ kromoszómák párosodását és a maximális erősségű transz-reguláció lehetőségét. Egy ilyen speciális deléció keletkezésének igen kicsi a valószínűsége a sok feltétel egyidejű teljesítése miatt. Saját kísérleteinkben közel 200,000 egyed átvizsgálása során egy ilyen ígéretes jelöltet találtunk, ami azonban sterilnek bizonyult. *Duncan* (*McCall* és *mtsai.*, 1994) hasonló méretű kísérlete (~260,000 légy) során sem sikerült az összes feltételnek eleget tenni. Az *Ubx* doménban azonban létezik ilyen deléció (*Martinez-Laborda* és *mtsai.*, 1992). Az is elképzelhető, hogy az *Abd-B* domén eltérő szerkezete (négy alternatív promóter jelenléte) vagy egyéb okok miatt nem lehetséges a cisz-helyzetűvel azonos erősségű transz-kapcsolat az *Abd-B* doménban. Noha kidolgoztunk egy, az eddigieknél hatékonyabb módszert ilyen jellegű deléciók izolálására, kétséges, hogy alapvető, új információkhoz juthatnánk-e a további, ezirányú kísérletek folytatása során. E helyett, véleményünk szerint, talán érdekesebb lenne azon gének feiderítése, melyek termékeik révén vesznek részt az *Abd-B* 5' végét és a szabályozó régiókat összetartó rögzítő komplex felépítésében.

Azokban a szelvényekben, melyekben csak egy kópia *iab-7* szabályozó elem működik, az aktiváló hatás nagyobb része a cisz-helyzetű, míg kisebb része a transz-helyzetű *Abd-B* génre jut. A transz-komponens azonban nem elég ahhoz, hogy látható *Fab-7* fenotípust okozzon akkor, ha a cisz-helyzetű promóter ép

(például $Fab-7Abd-B^{D16}I+$ esetében, 56. oldal, 8/b ábra). Ugyanakkor pontosan ilyen mértékű transz-komponens elvesztése látványos fenotípusbeli változást okoz a $Fab-7IAbd-B^{D16}$ transz-heterozigótában a $Fab-7I+$ heterozigóthoz képest (47. oldal, 5/c-a ábra). Ez csak úgy magyarázható, ha feltételezzük, hogy nem lineáris az összefüggés a $Fab-7$ fenotípus mértéke (az $Abd-B$ RNS illetve fehérje mennyisége) és az $iab-7$ szabályozó elem aktiváló hatásának erőssége között (lásd 20. ábra).

20. ábra. A $Fab-7$ fenotípus mértéke és az $iab-7$ elem aktiváló hatásának erőssége közötti összefüggés. Az ábrázolt összefüggés a hatodik tergít méretén alapszik. A kettős szaggatott vonal a látható $Fab-7$ -jellegnek megfelelő, feltételezett szintet jelöli. (a.) $Fab-7$ homozigóta, (b.) $Fab-7$ hemizigóta, (c.) $Fab-7IAbd-B^{D16}$, (d.) $Fab-7Abd-B^{D14}I+$, (e.) $Fab-7Abd-B^{D16}I+$.



A $BX-C$ szerkezete (Peiffer, 1987, 116. oldal, 23. ábra) és működési modellje (Lewis, 1982, 117. oldal, 24. ábra) szerint egy cisz-regulátor aktív marad a hátrébb elhelyezkedő szelvényekben is, noha úgy tűnik, hogy erre nincs semmi szükség. A cisz-regulátorok hatása ugyanis nem összegződik egy adott szelvényben, annak identitását csak az abban a szelvényben leelőször aktív, a legerősebb (a

legmagasabb *Abd-B* géntermék-szintet biztosító) szabályozó elem határozza meg. Ez azt sugallja, hogy egy adott szelvényben a gyengébb elemek nem létesítenek kapcsolatot a promóterrel, mert ellenkező esetben ennek fenotípusosan is meg kellene nyilvánulnia. Nem tudjuk, hogy ez miért van így, hiszen a promóter nem „telítődik” egy szabályozó elemmel létesített kapcsolat során. Erre példa a hiperaktiváció jelensége, mikor egynél több, azonos erősségű szabályozó elem létesít kapcsolatot egy promóterrel. Lehet, hogy egyszerűen térbeli okok miatt választódnak le a gyengébb szabályozó régiók a promóterről. Ennek modellezésére hasonlítsuk egy nadrágszíjhoz a DNS-t, ahol az *Abd-B* promóter a csat, az egyes szabályozó régiók pedig a lyukak a szíjon. Ahogy egyre szűkebbre vesszük a szíjat, úgy váltják egymást az egyes *iab*-régiók az *Abd-B* promóteren az egyre hátrébb elhelyezkedő szelvényekben: a leglazább állapotot az *iab-5*-tel, míg a legszűkebbet az *iab-7*-tel létesített kapcsolat jelenti (ez utóbbi szabályozó régió van ugyanis legközelebb az *Abd-B* génhez). Ezen mechanisztikus modell alapján kizárt, hogy két különböző erősségű cisz-regulátor egyidejűleg létesítsen kapcsolatot a promóterrel a közbeeső DNS-szakasz kihukolódása révén. A homológ kromoszómák párosodása miatt, egy ehhez hasonló eseménynek kell bekövetkeznie a *Fab-71+* heterozigóták A6-jában, ahol a transz-reguláló *iab-7* elem leválasztja a párosodó homológ, vad kromoszómán lévő *Abd-B* génről a cisz-helyzetű *iab-6* régiót. Úgy tűnik, hogy még ez a viszonylag gyenge transz-kölcsönhatás is erősebb alapokon nyugszik, mint amit egy *iab-6* elem tud létesíteni a „saját” (cisz-helyzetű) promóterével. Ellenkező esetben különbözne a *Fab-71+* és *Fab-71Df(3R)R59* hímek hatodik tergitének a

mérete (a *Df(3R)R59* deléció ugyanis eltávolítja a szabályozó régiókat az *iab-7*-től egészen a *bx-d*-ig, de sértetlenül hagyja az *Abd-B* gént).

Mind az adult kutikula mind az embrionális CNS esetében a transzvekción vizsgálata során talákoztunk olyan kivételes esettel is, amikor klonális jellegeket észleltünk. Így például a *Df(3R)U110iab-7^{Sz}* heterozigóta hímek hetedik potroh-szelvényén eltérő méretű tergít-darabkák figyelhetők meg. A keskeny hetedik tergít-daraboknak megfelelő sejtklónok igen erős (az *Abd-B* gén 5' helyzetű deléciói közül a legerősebb) komplementációt eredményező transz-regulációra utalnak, míg a széles hetedik tergít-klónok a komplementáció illetve a transz-reguláció teljes hiányát jelzik. Ehhez hasonlóan szabálytalan, „kétállapotú” mintázat figyelhető meg az *In(3R)Fab-7iab-7^{R5}||In(3R)Fab-7R5^LR7^R* vagy *Fab-7Abd-B^{D16}iab-7^{I6}* embriók CNS-ében a PS11-ben és a PS12-ben. Az egyes neuroblaszt-csoportok e két szelvényben vagy erősen festődnek *Abd-B* ellenanyaggal, vagy egyáltalán nem. A transzvekción mutató jellegek esetében tudjuk, hogy a homológ kromoszómák párosodásának mértéke a politén nyálmirigy-sejtekben jó összhangban van az adott szövet esetében megfigyelhető fenotípussal. A fenti két esetben a *BX-C* nem párosodik a nyálmirigy-sejtekben, mégis, a kapott eredmények e homológ lókuszon egyfajta fizikai közelségére utalnak a megfelelő (adult epidermisz illetve embrionális CNS) szövetekben. A *bithorax-komplex*-ről ismert, hogy nem működik a nyálmirigy-sejtjeiben (Zink és Paro, 1989). Elképzelhető viszont, hogy létezik egy olyan mechanizmus, ami lehetővé teszi a homológ lókuszon kölcsönhatását azokban a sejtekben, melyekben az adott gén aktív. Ez a rendszer szükségszerűen eltér attól,

ami a homológok párosodását biztosítja a nyálmirigy sejtekben. Egy ilyen lehetséges mechanizmus lehet a nukleáris kompartmentalizáció, melynek lehetőségét *Zachar* és munkatársai már 1985-ben javasolták a transzvekción egyes eseteiben. E nézet szerint az adott sejtben (szövetben) aktív gének a sejtmag olyan részeiben helyezkednének el, melyben az egyes transzkripciós faktorok szabadon hozzáférhetnek az adott génekhez, míg az inaktív géneket magába foglaló sejtmag-kompartmentek esetében erre nincs mód. Az utóbbi típusú kompartmentek létezését látszik igazolni *Messmer* és munkatársai (1992) eredménye, miszerint szövettenyészetből származó *Drosophila* sejtek interfázisos magvaiban egymástól elkülönülő tér-részek mutathatók ki a kromatin inaktív állapotát fenntartó *Polycomb* csoport névadó tagja ellen készült ellenanyag segítségével. Mivel e csoport tagjai a genetikai kísérletek alapján egymással együttműködve látják el feladatukat, valószínű, hogy e kompartmentekben is több *Polycomb* csoportba tartozó fehérje található. Ezt igazolva *Franke* és munkatársai (1992) *Drosophila* embriók nukleáris extraktumából immun-precipitáció révén izoláltak egy olyan $2-5 \times 10^6$ Da molekulasúlyú multimer fehérje-komplexet, amely erősen reagált a POLYCOMB és a POLYHOMEOTIC fehérje ellen készült ellenanyagokkal. Ezentúl, *Franke* és munkatársai (1992) azt is megállapították, hogy e két fehérje azonos eloszlást mutat a nyálmirigy-óriáskromoszómákon való kötődésük alapján. Ezek alapján léteznie kell az ellenpéldának is, vagyis olyan sejttagon belüli tér-részeknek is, melyekben az adott sejtekben éppen működő gének találhatóak. Sikerült izolálni egy olyan két megadalton molekulasúlyú fehérje-komplexet, melyben eddig két *trithorax*-csoportba

tartozó gént azonosítottak (*brahma*, *Dingwall* és *mtsai.*, 1995, illetve *ISW2*, *Elfring* és *mtsai.*, 1994). Elképzelhető, hogy a *trx*-kompartmentben lévő gének fizikailag közel kerülnek homológ párjukhoz, ezáltal képesek lesznek egymás működését befolyásolni. Ezt a feltevést támogatja *Castelli-Gair* és munkatársai (1990) adatai, miszerint a *Cbx¹Ubx¹* kettős mutációt hordozó harmadik kromoszóma képes kölcsönhatásba lépni - ezáltal látható *Cbx* fenotípust okozni - az egyébként nem párosodó, X-kromoszómán lévő homológ *BX-C* régióval akkor, ha mutáció révén lecsökkentjük az ilyen egyedekben a POLYCOMB fehérje mennyiségét.

Duncan (*Hoppmann* és *mtsai.*, 1995) és *Sakonju* (*Hendrickson* és *Sakonju*, 1995) tőlünk függetlenül szintén kimutatták a transzvekciónak előfordulását az *Abd-B* doménben. Megállapították, hogy amennyiben az *Abd-B* gén 5' vége részben vagy teljesen hiányzik, akkor az így szabaddá váló cisz-regulátor régiók képesek szabályozni a homológ kromoszómán lévő, transz-helyzetű *Abd-B* gént, ha annak „saját” (cisz-helyzetű) szabályozó elemei hiányoznak illetve működésképtelenek. Tőlünk eltérően ehhez ők nem a *Fab-7* mutációt használták. A *yellow* gén transzvekciónak (*Geyer* és *mtsai.*, 1990) hasonlóan, kísérleti rendszerük arra épült, hogy a szabályozó régiók illetve az *Abd-B* gén mutációi a létrejövő transz-reguláció miatt részlegesen komplementálják egymás hatását, melynek eredményeként sötétén pigmentált (a vad típushoz hasonló) lesz a hímek hatodik és hetedik potrohszelvénye. Eredményeinkhez hasonlóan ők is azt kapták, hogy a *zeste* gén mutáció nem befolyásolja a transzvekciónak a *bithorax-komplex* e részében. A mi adatainktól eltérően, az általuk vizsgált kölcsönhatás igen ellenálló bizonyult a

kromoszómális átrendeződések gátló hatásával szemben az adult epidermisz esetében. Erre magyarázat lehet, hogy az A5-jelleg (feketén pigmentált tergit) egy lényegesen alacsonyabb *Abd-B* RNS illetve fehérje szintnek felel meg, mint ami az A6 → A7 transzformációhoz (*Fab-7* jelleg) szükséges, ezért ennek eléréséhez elegendő egy gyengébb erősségű párosodás is. De az is elképzelhető, hogy két eltérő mechanizmus biztosítja a párosodást e két különböző transzvektációs rendszerben.

Az embrionális CNS-ben azonban mi is azt tapasztaltuk, hogy csak többszörös, a *BX-C*-ben töréspontot hordozó átrendeződés képes észrevehetően csökkenteni a párosodás-függő *Fab-7* fenotípust. E mellett kimutattunk egy másik, szintén transz-reguláción alapuló kölcsönhatást is, amely látszólag független a nyálmirigy-sejtekben megfigyelhető homológ kromoszóma-párosodástól. Valószínű, hogy az utóbbi esetben a kölcsönhatás közvetítésében fontos szerepet játszik az a körülbelül tíz kilobázis hosszú DNS-szakasz, mely az *iab-7* régió és az *Abd-B* gén között helyezkedik el. Feltételezzük, hogy ez a régió rendkívül nagy távolság (megabázisok) esetén is képes kölcsönhatásba lépni homológ párjával (például a nukleáris kompartmentalizáció során), melynek eredményeként kerül egymáshoz közel az *iab-7* regulátor elem és az *Abd-B* gén. Úgy tűnik, nem lehet ezt a kapcsolatot a „hagyományos értelemben” kromoszómális átrendeződések (strukturális heterozigócia) révén megszüntetni. Épp ellenkezőleg, az egyetlen hatékony módszernek azt találtuk, ha a tíz kb hosszú DNS-szakaszt eredeti helyéről elmozdító átrendeződést (*In(3R)Fab-7iab-7^{RS}*) homozigóta állapotba hozzuk,

megteremtve ezáltal egy alternatív párosodás lehetőségét az immár azonos pozíciójú DNS-szakaszok között (lásd 72. oldal, 17. ábra). Velünk összhangban, *Duncan* is kitüntetett szerepűnek találta ezt régiót (*Hoppmann és mtsai.*, 1995).

Az embrionális szövetek vizsgálata során megállapítottuk, hogy nem mutatható ki transz-reguláció a mezo- és ektodermában az egyedfejlődés „germ-band retraction” kezdeti állapotáig. Ennek oka feltehetőleg az, hogy a *bithorax-komplex* nem párosodik ezekben a szövetekben az egyedfejlődés korai szakaszában.

5. ÖSSZEFOGLALÁS

A magasabbrendű eukarióta-génszabályozás tanulmányozására kiválóan alkalmas az ecetmuslica *bithorax-komplexe*, melynek finom működésbeli változásai is jól látható homeotikus transzformációt okoznak. Így például e génkomplex *Abd-B* doménjét érintő, domináns *Fab-7* mutáció hatására a muslicák hatodik potrohszelvénye hetedikké módosul. E transzformáció következtében a heterozigóta hímek hatodik tergijének mérete körülbelül egynegyedére csökken a vad hatodik tergithez képest. Megállapítottuk, hogy a *Fab-7l+* hímek hatodik tergitlemeze érzékenyen reagál az *Abd-B* gén működését befolyásoló különböző hatásokra, mérete attól függ, hogy milyen magas az *Abd-B* géntermék szintje ebben a potrohszelvényben. Ezt felhasználva sikerült kimutatnunk egy eddig ismeretlen, a homológ kromoszómák párosodásától függő, transzvektációs kölcsönhatást az *Abd-B* doménben. A különböző mutánsok keresztezéséből származó felnőtt egyedek kutikula-vizsgálata során megállapítottuk, hogy:

- az *iab-7* régió aktiváló hatása korlátozott, ami megoszlik a cisz- és a transz-helyzetű *Abd-B* gén között azokban a szelvényekben, melyekben csak egy aktív állapotú *iab-7* elem és két párosodó *Abd-B* gén található
- a megoszlás nem egyenlő mértékű, a cisz-helyzetű génre nagyobb hányad jut
- ha a transz-helyzetű *Abd-B* gén pontmutációt hordoz, akkor párosodás-

függően, dominánsan szuppresszálódik a *Fab-7* fenotípus

- a *Fab-7/Abd-B* transz-heterozigóták hatodik potrohszelvényében inaktív, párosodó *iab-7* elem nem játszik szerepet az általunk leírt transzvekción, megléte illetve hiánya esetén azonos fenotípust kapunk
- a szuppresszió annak a következménye, hogy az *iab-7* aktiváló hatásából a transz-helyzetű *Abd-B* génre jutó rész elvész a mutáció miatt
- a szuppresszió érzékenyen reagál (az *Ubx* doménben ismert párosodás-függő kölcsönhatásokhoz hasonlóan) a kritikus régióban töréspontot hordozó kromoszómális átrendeződések jelenlétére
- a szuppresszió nem észlelhető azokban a szelvényekben, melyekben két párosodó, aktív állapotú *iab-7* elem található
- az *Abd-B* gén 5' végén upstream irányban deléciót hordozó allélek eltérő mértékben, a deléció méretétől függően komplementálják az *iab-7^{Sz}* deléciót
- a komplementáció erőssége növekszik az 5' helyzetű deléciók méretével az ép *iab-7* régió egyre gyengébb cisz-, de ezáltal egyre erősebb transz-helyzetű kötődése miatt
- az *Ubx* génhez hasonlóan, az *Abd-B* gén is hiperaktiválható
- az általunk vizsgált mutáns-kombinációk esetében a *zeste* gén nem befolyásolja a transzvekciót az *Abd-B* doménben

Eredményeink arra utalnak, hogy az *Abd-B* gén proximális promóterétől upstream elhelyezkedő DNS-szakasz rendkívül fontos szerepet játszik a szabályozó elemek

rögzítésében. Ez a kölcsönhatás akkor is létrejön és fennmarad, ha a transzkripció iniciációs helye és a promóter régió is hiányzik. Ezek alapján úgy tűnik, hogy a szűk értelemben vett promóter funkció és az enhanszert a gén 5' végéhez rögzítő mechanizmus fizikailag is elkülöníthető egymástól. Megállapítottuk, hogy a rögzítésért felelős upstream régió több kilobázis hosszú, méretétől függ a szabályozó régiókkal létrehozott kapcsolat erőssége. Ezek szerint a rögzítést végző fehérjekomplex számos elkülönülő elemből tevődik össze, melyek mindannyian részt vesznek és együttműködnek a maximális erősségű cisz-kapcsolat kialakításában és fenntartásában. Valószínű, hogy az elemes felépítésből adódó nagyfokú stabilitás miatt az egyszer már kialakult, teljes mértékben cisz-helyzetű enhanszer-gén kapcsolat csak részlegesen, kismértékben tud átépülni transz-helyzetűvé egy dinamikus egyensúlyi állapot kialakulása során. Feltehetőleg ez lehet az oka annak, hogy az *iab-7* aktiváló hatásából nagyobb hányad jut a cisz-helyzetű *Abd-B* génre. Ezek szerint a cisz-kapcsolat az előtt alakul ki, hogy a homológ kromoszómák párosodnának egymással. Ezt igazolni látszik az a megfigyelésünk, miszerint az embrionális egyedfejlődés első felében, a mezo- és ektodermában nem mutatható ki transz-reguláció, a később kialakuló központi idegrendszerben viszont igen. E szövetben végzett immun-hisztokémiai vizsgálataink során megállapítottuk, hogy:

- az *iab-7* cisz-regulátor régió mellett az *iab-5* és *iab-6* régiók is képesek transz-regulációra
- a párosodás-függő kölcsönhatások a CNS-ben kevésbé érzékenyek a kromoszómális átrendeződések gátló hatására, mint az adult epidermiszben

- amennyiben citológiaiailag nem mutatható ki a homológ kromoszómák párosodása a nyálmirigy-sejtekben, a CNS-ben akkor is észlelhető transz-regulációra utaló, szabálytalan mintázatú festődés

Így valószínű, hogy az embrionális CNS-ben két különböző, transz-reguláción alapuló kölcsönhatást mutattuk ki: az egyik függ a nyálmirigy-sejtekben megfigyelhető, homológ kromoszóma-párosodástól, míg a másik látszólag ettől független. Véleményünk szerint, az utóbbi esetben a transz-reguláció kialakításában fontos szerepet játszik az *iab-7* régió és az *Abd-B* gén 3' vége között elhelyezkedő, körülbelül tíz kilobázis hosszú DNS-szakasz. Feltételezzük, hogy a nukleáris kompartmentalizáció révén rendkívül nagy távolság (megabázisok) esetén is képes ez a kromoszóma-szakasz kölcsönhatásba lépni homológ párjával, ami biztosítja az *iab-7* szabályozó elem és az *Abd-B* gén között a kellő közelséget.

Vizsgálataink a fentiek megállapításán túl további, a *Drosophila*-genetikában mások számára is hasznosítható gyakorlati jelentőséggel bírnak. A kísérleti rendszerünket használva könnyen lehet izolálni:

- kromoszómális átrendeződéseket, melyek egyik töréspontja a centromer és az *Abd-B* gén közé esik
- az *Abd-B* génen belül pontmutációkat és a gén 5' végét eltávolító deléciókat, illetve lehetőség van ezek egyszerű, gyors, megbízható elkülönítésére molekuláris vizsgálat nélkül

Az előbbiek mellett, munkánk további gyakorlati jelentősége lehet, hogy az általunk kimutatott transzvekciónak segítségével nyomonkövethetjük az egyes kromoszómákat embriókban és felnőtt egyedekben egyaránt, még akkor is, ha az adott genotípusban egy extra kópia *bithorax-komplex* menekíti, maszkírozza az *Abd-B* mutációk okozta egyébként domináns fenotípust.

Értekezésem egy különleges génszabályozási mód kimutatásáról és hatásmechanizmusának feltárásáról szól. Ezt a homológ kromoszómák párosodásától függő, ún. transzvekciónak jelenséget az *acetmuslica* egyik homeotikus gén-családjában, a *bithorax-komplex Abd-B* doménjében vizsgáltuk a *Fab-7* mutáció segítségével. A magasabbrendű eukarióta élőlényekben (így az emberben is) a homeotikus gének hasonló szerepet töltenek be a test kialakításában, mint a *Drosophila* esetében, molekuláris szerkezetük is igen hasonló. A transzvekciónak jelensége szintén megfigyelhető más élőlényekben is, nemcsak az *acetmuslicára* jellemző, speciális biológiai folyamat. Ezek alapján úgy gondolom, hogy eredményeink egy része általános érvényű lehet, hozzájárulhat az eukarióta génszabályozás egyes részleteinek megismeréséhez és megértéséhez.

6. ANGOL NYELVŰ ÖSSZEFOGLALÓ

SUMMARY

Proper development of an organism requires precise regulation of gene expression. Interactions between promoter and enhancer elements provide one level of this regulation. Genetic studies gave evidence that these interactions can be formed not only in *cis* but in *trans* as well, between non-contiguous DNA molecules. Such *trans*-interactions have been found to be responsible for several examples of intragenic complementation in *Drosophila melanogaster*. These *trans*-interactions depend on the physical proximity of homologous chromosomes, because they are inhibited when one of the homologues carries a rearrangement which reduces the pairing of homologous chromosomes as described first in *Drosophila*. There are examples which suggest that pairing-dependent *trans*-interactions, termed ***transvection***, also occur in other organisms such as plants, animals and humans. Moreover, most recent studies showed that disruption of the pairing of homologues reduces transcription on both chromosomes indicating that chromosomal synapsis has a general enhancing effect on transcription.

Our study was initiated by the finding that point mutations of the *Abd-B* gene in *trans* dominantly suppress the phenotypic effect of the dominant gain of function mutation, *Fab-7*, in *Drosophila*. *Abd-B* is one of the three homeotic genes of the *bithorax-complex* (*BX-C*) which controls segmental identity in the posterior half of the

Drosophila body. The level of *Abd-B* gene product increases gradually from the fifth to the ninth abdominal segment as a consequence of the discrete activating effect of segment specific *cis*-regulatory regions. The *Fab-7* mutation removes a boundary separating the *iab-6* and *iab-7* *cis*-regulatory regions, which are specific for the sixth (A6) and the seventh (A7) abdominal segments, respectively. As a consequence of the fusion between the two *cis*-regulatory regions, *iab-7* becomes ectopically active in the sixth abdominal segment. Accordingly, in the A6 of *Fab-7* homozygotes the level of the *Abd-B* gene product is as high as in the A7 of wild type flies. As expected, A6 is completely transformed into A7 in this genotype, which is most obvious in adult males by the virtual loss of the sixth abdominal segment (as A7 does not participate in the formation of the adult cuticle in this sex). However, in the A6 of *Fab-7* heterozygotes the level of *Abd-B* gene product is intermediate between the levels seen in the A6 and the A7 of wild type flies. Accordingly, the transformation of A6 into A7 is only partial in *Fab-7* heterozygotes; males have a vestigial sixth abdominal segment. These results indicate the existence of an inverse proportionality between the level of the *Abd-B* gene product in A6 and the size of this abdominal segment.

As null mutations of the *Abd-B* gene in *cis* completely revert this posteriorly directed transformation of A6 (that is *Fab-7Abd-B1+* heterozygotes do not show any degree of *Fab-7* characteristics), it was intriguing to find that *Abd-B* point mutations in *trans* significantly suppress the *Fab-7* phenotype (that is the size of A6 is enlarged in *Fab-7|Abd-B* males as compared to *Fab-7|+* heterozygotes). This suppression

proved to be a case of transvection as it was completely eliminated when the pairing of the homologous third chromosomes was inhibited by rearrangements.

By genetic methods we showed that the activating effect of *iab-7* is limited and shared between the *Abd-B* genes in *cis* and in *trans* in those segments where only one copy of *iab-7* is active. The paired inactive *iab-7*, present in the A6 of *Fab-7|Abd-B* heterozygotes, does not have a role in the *trans*-suppression of the *Fab-7* phenotype, as suppression is not modified in its absence. The suppression is simply the consequence of the unproductive *trans*-regulation of the defective *Abd-B* gene by the ectopically active *iab-7*. In contrast to *Fab-7|+* heterozygotes, *trans*-regulation in *Fab-7|Abd-B* individuals does not produce functional ABD-B protein, therefore, the *trans*-activating effect of *iab-7* is wasted in this genotype. The sharing of *iab-7* can not occur when the pairing of homologues is prevented; in this case *iab-7* regulates the intact *Abd-B* gene in *cis* with full capacity. Similarly, suppression is not observed when both copies of *iab-7* are active in A6, as in the case of *Fab-7Abd-B|Fab-7* heterozygotes. We propose that under these conditions both *iab-7* regions regulate their own *Abd-B* gene in *cis*.

From the different phenotypes of *Fab-7Abd-B|+* *cis*- and *Fab-7|Abd-B* *trans*-heterozygotes we concluded that the sharing of the activating effect of *iab-7* is asymmetrical, the *Abd-B* gene in *cis* is preferred. However, this ratio can be altered in favor of the *Abd-B* gene in *trans* by the removal of the region upstream of the transcriptional initiation site of the *Abd-B* gene in *cis*. Surprisingly, *cis*-interaction between *iab-7* and the *Abd-B* gene is not completely eliminated if the region that extends from 3 kb downstream to 7 kb upstream of the 5' end of the *Abd-B* gene is

deleted. Our results strongly suggest the existence of a mechanism operating independently of transcription which tethers *cis*-regulatory regions to the upstream region, and should, therefore, be different from the transcriptional machinery that is supposed to lock enhancers to the promoter region.

Moreover, we demonstrated that deletions of different sizes in the upstream region modify differently the ratio of *cis*- and *trans*-interactions between the regulatory region, *iab-7*, and the *Abd-B* gene. We observed that the strength of *cis*-interaction is inversely proportional to the size of the deletion in the upstream region, suggesting that this region consists of numerous discrete elements that cooperate in locking individual *cis*-regulators to the *Abd-B* gene. We suppose that due to the high stability of the anchoring complex which arises from its multicomponent assembly, once an interaction is established between the regulatory regions and the promoter through the cooperation of numerous components in *cis*, the complex cannot be fully reconstructed at the other promoter in *trans*. Only partial rebuilding is possible, resulting in a dynamic equilibrium which is shifted towards the *cis*-interaction. The formation of a dynamic equilibrium in each cell would explain the non-clonal appearance of the phenotypes we examined. Additionally, the shifted equilibrium may explain why *cis*-regulation is stronger than *trans*-regulation. This explanation, however, requires that the formation of *cis*-interaction precedes the establishment of the tight pairing of homologous chromosomes. Indeed, we could not detect *trans*-regulation during the first half of the embryonic development, suggesting that the homologous chromosomes are not paired in the early stage of ontogenesis.

Contrary to the earlier stages of embryogenesis, we do detect *trans*-regulation in the embryonic central nervous system (CNS) after the beginning of germ band retraction stage. Using monoclonal antibodies raised against the ABD-B protein, we provided immuno-histochemical evidence for the ability of *cis*-regulatory regions (*iab-5* and *iab-6*) to *trans*-regulate the *Abd-B* gene similarly to *iab-7*. Although it is difficult to compare transvection in the CNS and in the adult abdominal epidermis, it seems that *trans*-interaction in the CNS is considerably more tenacious than in the adult abdomen. Moreover, even when pairing of homologous chromosomes is inhibited by rearrangements in the salivary gland cells, we still detected a weak clonal staining in the embryonic CNS. We conclude that two different types of *trans*-regulation exist in the CNS: one depends on the pairing of homologues, while the other occurs in the absence of chromosomal synapsis. In the latter case we suppose the existence of a mechanism that brings homologous genes into physical proximity to each other, hence allowing *trans*-regulation, in only those tissues where that particular gene is expressed (the *bithorax-complex* is inactive in the salivary gland cells). Our data suggest that this type of *trans*-regulation depends on an approximately 6-10 kb long stretch of DNA which lies between the *iab-7* regulatory element and the 3' end of the *Abd-B* gene. We suppose that this region can find and pair with its homologue over extremely long distances bringing the *iab-7* and the *Abd-B* gene into the required proximity.

Since most of the previously documented cases of transvection depend on the presence of a wild type copy of the *zeste* gene, we tested its involvement in *trans*-

regulatory interactions with the *Abd-B* gene. Surprisingly, we found that mutations in the *zeste* locus had no apparent effect on any of the *trans*-regulatory interactions in the *Abd-B* domain described above. This finding suggests that *zeste* function may be redundant or not required for transvection in the *Abd-B* domain.

My thesis focuses on a special type of gene regulation which depends on the pairing of homologous chromosomes. Namely, we detected transvection in the *Abd-B* domain of the homeotic *bithorax-complex* and revealed its mechanism. The sequence of homeotic genes show significant conservation and they also have a similar role in the organization of body formation in various phylae of higher order animals and humans. Similarly, the phenomenon that transvection represents in a broader sense, that is communication between alleles, is not unique to *Drosophila*. Very likely, transvection is responsible for the so called paramutations in plants and may also be involved in certain human disorders. In the light of these, some of our results may provide a general clue to the understanding of certain aspects of eukaryotic gene regulation.

7. FÜGGELÉK

7.1. Tudományos háttér

7.1.1. Miért használnak ecetmuslicát a genetikai kísérletekben?

Az ecetmuslica (*Drosophila melanogaster*) több szempontból is ideális kísérleti állat genetikai vizsgálatokhoz. Valódi soksejtes élőlény létére az élesztőével összevethető méretű a genomja, mely mindössze négy kromoszóma-párra tagolódik. Lárvális óriáskromoszómái felbecsülhetetlen értékűek citogenetikai vizsgálatokban, mivel „felnagyított” finomszerkezetük mellett még a homológ kromoszóma-párosodást is mutatják, melynek segítségével a kromoszóma szerkezeti megváltozásai (kromoszóma-mutációk) is elemezhetők. A rekombinációt kizáró, többszörös kromoszómális átrendeződések (inverziók) felhasználásával kialakított ún. „balanszer kromoszómák” és az „ellensúlyozott letális rendszer” alkalmazásával lehetséges az egyes mutációk könnyű és egyszerű, automatikus fenntartása beltenyésztett vonalakban (törzsekben). A számos rendelkezésre álló, ismert térképhehelyzetű mutáció segítségével könnyű egy új, eddig ismeretlen mutáció pontos genetikai lokalizációja, azonosítása. A domináns mutációk lehetővé teszik egy-egy kromoszóma követését fenotípus alapján akár generációkon keresztül. Mindezen rendkívüli genetikai lehetőségek mellett, az ecetmuslica nagyon könnyen kezelhető is kis (de nem túl kicsi) mérete, rövid generációs ideje, utódainak nagy száma és egyszerű tenyésztetősége miatt.



A genetika fejlődése során egyre inkább molekuláris biológiai tudománnyá vált. Az új követelményeknek megfelelően, a *Drosophila* jól használható kísérleti objektum a molekuláris szintű vizsgálatokban is.

A legfontosabb érv az ecetmuslica használata mellett az, hogy a törzsfejlődés során alapvető biológiai folyamatokban (például a sejt életében, a testfelépítés kialakításában, a génműködés szabályozásában) résztvevő gének szerkezete és működése nagymértékben konzerválódott, így a *Drosophila* vizsgálata során összegyűjtött ismeretek jelentős részét kiterjeszthetjük más élőlényekre is. A számos, molekulárisan is ismert szerkezetű muslica-gén és a könnyen létrehozható, ún. „*transzgenikus*” muslicák segítségével fényt deríthetünk más, genetikailag nehezebben vizsgálható, kevésbé ismert élőlényekben található gének szerepére és működésére is.

Mindezek alapján elmondhatjuk, hogy az ecetmuslica az egyik leggyakrabban és legjobban használható kísérleti állat genetikai, toxikológiai, biokémiai és fejlődésbiológiai kutatásokban.

7.1.2. Az óriáskromoszómák szerveződése

A *Drosophila* és más *Diptera* fajok lárvális szöveteinek többségére jellemző a politénia, vagyis e sejtekben a kromoszómák sejtosztódás nélkül replikálódnak. A politén sejtek a normális, diploid állapothoz többé már nem térnek vissza, osztódásra képtelenek, funkciójuk ellátása után elpusztulnak. A politénia foka az egyes lárvális szövetekben eltérő, a nyálmirigy sejtjeiben a legnagyobb, melyek DNS-tartalma az utolsó lárvastádium végére a diploid sejtekének kb. ezerszeresére nő. A politén lárvális sejtekben ún. „óriáskromoszómák” jönnek létre azért, hogy a replikáció után a testvérkromatidák nem válnak el egymástól, hanem hossz tengelyük mentén szorosan összetapadnak. Az óriáskromoszómákat olyan speciális funkciójú sejtek interfázisos kromoszómáinak tekinthetjük, melyekben az intenzív RNS-szintézishez szükséges és abban résztvevő gének száma (a genom jelentős részével együtt) megsokszorozódott. Érdekes módon a politénia nem terjed ki a *Drosophila* teljes genomjára: nem politénizálódik a kromoszóma-karok centromerhez közel eső része (központi heterokromatin), a kromoszóma-karok csúcsi részei (telomerek) és az Y kromoszóma.

Az óriáskromoszómáknak jellegzetes sávmintázata van, mely jól vizsgálható megfelelő festési eljárás után. A mintázatot különböző megjelenésű, erősen festődő sávok és gyengén festődő sávközök váltakozása adja. A sávok erős festődése magas DNS-tartalmuknak köszönhető, ami kb. tízszer-harmincszor nagyobb, mint a sávközökben. A sávok szélessége, morfológiai megjelenése és egymástól való

távolsága az adott óriáskromoszómára, és ezen belül is egy adott szakaszra jellemző. A sávmintázat alapján készítette el *Bridges* (1935) a *Drosophila melanogaster* nyálmirigy-óriáskromoszóma citológiai térképét. Minden kromoszómakart 20 nagy egységre osztott fel (1-től 20-ig az X-kromoszóma, 21-től 40-ig a 2. kromoszóma bal karja, 41-től 60-ig a 2. kromoszóma jobb karja, 61-től 80-ig a 3. kromoszóma bal karja, 81-től 100-ig a 3. kromoszóma jobb karja és 101-től 102-ig a kicsi, 4. kromoszóma).

A nagyobb egységeken belül hat, nagy betűkkel jelölt szakaszt (A-tól F-ig) határozott meg. Ezen szakaszok mindegyike egy-egy vastag sávval kezdődik. Végül arab számmal jelölt minden egyedileg elkülöníthető sávot. Így például a 60C5 egyetlen sávot jelöl a citológiai térképen. *Bridges* (1935) leírása alapján a *Drosophila melanogaster* genomja a lárvális nyálmirigy sejtekben 5072 sávból, illetve az ezeket elválasztó sávközökből áll. Az újabb, elektronmikroszkópos citológiai vizsgálatok (*Berendes* 1970, *Saura* és *Sorsa* 1979) igazolják *Bridges* eredeti térképének érvényességét, bár kisebb eltérések vannak a *Bridges* által kettősnek tekintett sávok számában.

Több, ún. „telítési kísérlet” során is azt kapták, hogy egy adott kromoszómaszakaszra térképezhető gének száma jól egyezik az azon a szakaszon található sávok számával (*Judd* és *mtsai.*, 1972, *Liu* és *Lim*, 1975). Sokáig vitatták, hogy a sávok vagy a sávközök felelnek-e meg egy-egy lókusznak, hiszen a sávközök is tartalmaznak egy-egy génnek megfelelő mennyiségű DNS-t. *Zhimulev* (1974) és *Jamrich* (*Jamrich* és *mtsai.*, 1977) kutatásai szerint mindkét álláspont képviselőinek

igaza van: a tömörebb szerkezetű sávokban (az egymás mellé rendeződött ún. „*kromomer*”-ekben) csak bizonyos szövetekben illetve testrészekben, meghatározott időben működő gének találhatók, míg a lazább szerkezetű sávközökben (az egymás mellé rendeződött ún. „*interkromomer*”-ekben) azok a gének találhatók, melyek minden szövetben, mindig működnek (ún. „*háztartási gének*”). A későbbi telítési kísérletek (*Young és Judd, 1978*) azonban feltárták, hogy a gének (komplementációs csoportok) száma nem mindig egyezik az adott kromoszóma-szakaszon található sávok/sávközök számával: a sávok száma néha több, mint az oda térképezhető gének száma, néha viszont a gének száma több, mint az adott szakaszon található sávok/sávközök száma. Ezt molekuláris módszerrel (*Northern*-analízis) is igazolva, *Bossy és munkatársai (1984)* kimutatták, hogy egy adott kromoszóma-szakasz esetén a látható sávok számánál közel négyszer több transzkripciós egység mutatható ki, végleg megdöntve ezzel az „egy gén - egy sáv/sávköz” elméletet.

Az óriáskromoszómákra sávos mintázatuk mellett, egy másik feltűnő morfológiai sajátosság is jellemző: helyenként gyengén festődő duzzanatok, ún. „puffok” figyelhetők meg. Mivel a puff-mintázat szövetenként eltérő, illetve egy szövet esetében az egyedfejlődés során változik, *Beermann (1952)* úgy vélte, hogy az egyes puffok gének aktivitását tükrözik. Ezt igazolta *Pelling (1959)*, aki kimutatta, hogy a puffokban intenzív RNS-szintézis folyik. A puffok tehát az óriáskromoszómák transzkripcionálisan legaktívabb helyeinek tekinthetők (*Daneholt, 1975*).

7.1.3. A *Drosophila melanogaster* peteképződése és egyedfejlődése

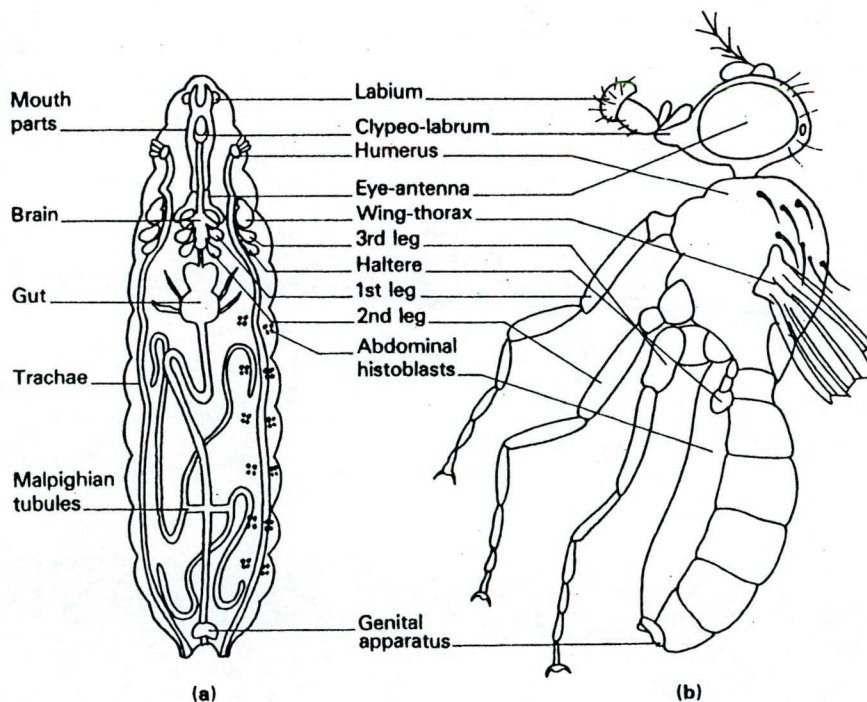
A *Drosophila* petéi a nőstény petefészket alkotó petecsövekben képződnek. A petecsövek csúcsaiban található ősvarsejtek egyenlőtlenül osztódnak: az egyik leánysejt ősvarsejt marad, míg a másiból négy egymást követő osztódás után egy petesejtből és 15 dajkasejtből álló petekezdemény képződik (Nöthiger és mtsai., 1978, Wieschaus és Szabad, 1979). A petekezdemény egyes sejtjei között az ún. „gyűrűcsatornák” révén citoplazmatikus kapcsolat marad fent. Ezeken a csatornákon keresztül fehérje- és RNS-molekulák, valamint sejtservecskék jutnak át a politén dajkasejtekből a transzkripcionálisan inaktív, diploid petesejtbe.

Megtermékenyítés után az anyai és apai pronukleusz nem olvad rögtön egybe, hanem csak az első, ún. „gonomerikus” osztódás után. A diploid sejtmagok tízpercenként újból osztódnak, de továbbra is közös citoplazmában maradnak. A 8. osztódási ciklus (256 sejtmag) után az eddig szétszórtan elhelyezkedő sejtmagok vándorolni kezdenek a pete felszíne felé, és egy sejtmagnyi vastag réteget hoznak létre a felszínen. A 13. osztódási ciklus után kialakulnak a sejtmagok körül a sejthártyák, ezáltal létrejön az egysejtnyi vastag blasztoderma. Ekkor aktiválódik a zigotikus gének zöme. A következő órákban az embrió térbeli újraszerveződésen megy keresztül. A gasztruláció során kialakulnak a belső sejtrétegek. A megtermékenyítést követő 5. órában az embrió teste szelvényekre oszlik, kialakul a később egyesülő három feji, a szintén három tor- és a nyolc potrohszelvény. A megtermékenyítést követő 22. órában (25 °C-on) az embrió

kikel és szelvényezettségét megőrizve lárvaként fejlődik tovább. A lárvá kétszer vedlik, majd bebábozódik. A bábban a politén lárvális szövetek feloldódnak.

A felnőtt muslica teste teljes átváltozás révén alakul ki: testrészei - az idegrendszer kivételével - nem a lárvális homológjaikból, hanem az ún. imaginális szervezdeményekből képződnek. Ezek a szervezdemények a lárvá testét „eleven táptalajként” használják, majd bábozódáskor hormonhatásra bonyolult szerkezeti átalakulásokon keresztül kialakítják a megfelelő felnőttkori struktúrát. Például a felnőtt állat torának a kültakarója ún. imágókorongból (imaginális diszkuszból), míg a potroh kutikulája ún. abdominális hisztoblasztokból alakul ki (21. ábra). A megtermékenyítést követő tizedik napon a felnőtt állatok kibújnak a bábból.

21. ábra. Lárvális imaginális diszkuszok és hisztoblaszt sejtek (a), és a belőlük képződő felnőtt struktúrák (b). (Wildermuth nyomán, 1970)



7.1.4. A *Drosophila melanogaster* egyedfejlődését szabályozó fő géncsoportok

Az *ecetmuslica* egyedfejlődése jól nyomon követhető az „*anyai hatású*”, a „*szegmentációs*” és a „*homeotikus*” gének mutációi révén.

Az *anyai hatású* gének mutációira nézve homozigóta nőstény a megtermékenyítő hím genotípusától függetlenül mindig mutáns utódot hoz létre. Klasszikus példa erre az embrió normális polaritási viszonyait megváltoztató mutációk esete. A homozigóta *dicephalic (dic)* (Lohs-Schardin, 1982) nőstényektől származó embriók elpusztulnak, mert nincs hátulsó részük, viszont két, tükör-szimmetrikus elülső, feji résszel rendelkeznek. Az ellenpélda, a „kétfarkú” embrió is ismert, melyet a *bicaudal (bic)* (Bull, 1966; Nüsslein-Volhard, 1977) mutáció okoz. Más anyai hatású gének mutációi a hát-hasi polaritást módosítják. Ezek alapján az *anyai hatású* gének egyik fő feladata az, hogy a majdani embrió polaritási viszonyait még a megtermékenyítés előtt, a petében kialakítsák.

A *szegmentációs* gének feladata a kezdetben szelvényezetlen embrió testének szelvényekre osztása. Az ebben a folyamatban résztvevő géneket három alcsoportra oszthatjuk. Az ún. „*gap*” gének az embriót szelvényeknél nagyobb testrészekre osztják. Például a *Krüppel (Kr)* gént elrontó mutációra (Gloor, 1954) homozigóta embrióknak hiányzik az összes tor- és az első öt potrohszelvénye. Az ún. „*pair-rule*” géneknek az egyes szelvények kialakítása a feladata. Nevüket onnan kapták, hogy minden második, páros vagy páratlan számú paraszegmentben fejtik ki hatásukat (a paraszegmentek az egymást követő szelvények

egy hátsó és egy elülső részéből állnak, mintegy fél szelvényvel „elcsúsztatva” helyezkednek el a szelvényekhez képest, **24. ábra, 117. oldal**). Ebbe a csoportba tartozik például a *fushi-tarazu (ftz)* gén (*Jürgens és mtsai.*, 1984), mely japánul szelvényhiányt jelent. Nevét onnan kapta, hogy a homozigóta mutáns embriókban minden páros számú paraszegment hiányzik. Az ún. „szegment-polaritás” gének alakítják ki az egyes szelvények anterior és poszterior részeit. Mutációik esetében a szelvények elülső illetve hátsó része hiányzik, viszont helyette tükörszimmetrikusan jelen van még egyszer a másik, normálisan is meglévő rész. *Szegment-polaritás* gén például az *engrailed (en)* (*Nüsslein-Volhard és Wieschaus*, 1980). Látható tehát, hogy a szelvényes szerkezet kialakítása eltérő felbontású szinteken valósul meg, ugyanakkor a három alcsoport génjei között bonyolult kölcsönhatási hálózat jön létre.

Az így kialakuló, kezdetben teljesen egyenértékű szelvények fokozatosan differenciálódnak, egymástól különbözőkké válnak. A *homeotikus* gének mutációi ezt a folyamatot megzavarhatják, illetve meggátolhatják. (A „*homeózis*” kifejezés *Bateson*-tól (1894) származik, aki olyan esetekben alkalmazta, mikor a test egyes részei (szelvényei) más testrészekké (szelvényekké) alakultak, például a csáp helyett láb, a billér helyett szárny nőtt ki.) A *homeotikus* gének szerepe ezek szerint az, hogy biztosítsák az egyes szelvények sejtjeinek genetikailag meghatározott specializációját. *Garcia-Bellido* (1977) „szelektor” géneknek nevezte el a *homeotikus* géneket, mivel ezen gének választanak egy-egy sejtcsoporthoz lehetséges fejlődési útjai közül, aktív illetve inaktív állapotuknak megfelelően. A szelektor gének az ún.

„realizátor” géneken keresztül fejtik ki hatásukat, melyeket aktiválni illetve inaktiválni képesek. Ezt alátámasztotta a *homeotikus* gének fehérjetermékében azonosított, DNS-kötésre képes szakasz, a *homeodomain* felfedezése (McGinnis és mtsai., 1984a). Más élőlényekben (béka, egér, ember) is kimutatták ezt a jellegzetes fehérjeszakaszt, és nagyfokú homológiát tapasztaltak az aminosav sorrendjében a különböző állattörzsek esetében is (McGinnis és mtsai., 1984b).

Az ecetmuslicában a *homeotikus* gének két nagy „gén-komplexet” alkotnak: az ún. „*Antennapedia-komplex*” (*Ant-C*) génjei fejtől a középtor elülső részéig, míg az ún. „*bithorax-komplex*” (*BX-C*) génjei a középtor hátsó részétől a potroh végéig terjedő szelvények egyedi jellegzetességeinek, identitásának kialakításáért felelősek.

7.1.5. A felnőtt *Drosophila melanogaster* testszelvényeinek morfológiája

A *homeotikus* géneket érintő mutációk következtében egyik szelvény egy másik szelvénné módosul. Hogy ezt a hatást felismerhessük, szükséges az egyes szelvények pontos morfológiai ismerete.

Míg a muslica lárvális állapotában három feji szelvény figyelhető meg, addig a felnőtt *Drosophila* feji szelvényei összeolvadtak. Ez az egybeolvadás tökéletes, ezért a felnőtt muslica fején nem figyelhető meg szelvényezettség.

A tort három elkülöníthető szelvény alkotja. Az előtoron található első pár láb első tarzális ízén a hímeken fésűszerű képződmények (ún. „*sex comb*”-ok) láthatók, melyek csak az előtori lábakon fordulnak elő. A középtoron található a szárny.

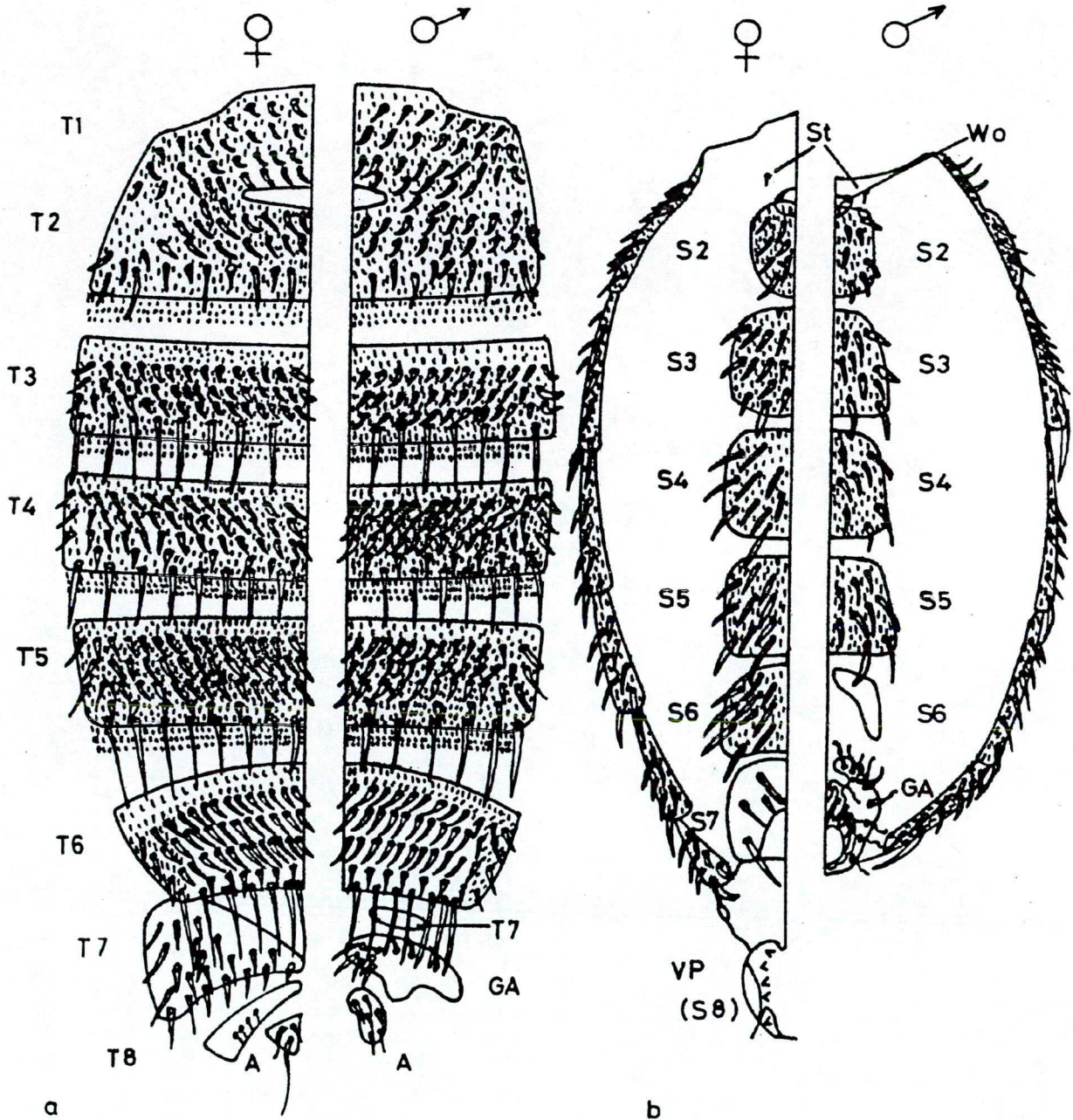
A középtori láb tíbiális ízéből két nagy, vastag serte nő ki (ún. „apikális szőrök”). Az utótori szelvényen található a billér és a harmadik pár láb, melyen jellegzetes struktúra nem figyelhető meg.

A potroh szintén szelvényezett. A hasoldalán található kitinlemezeket *szternit*-nek, a potroh hátlemezeit pedig *tergit*-nek nevezik. Az egyes potroh-szelvényeket **A** betűvel (abdomen), és a megfelelő számmal jelölik.

Az A1 tergitjén a szőrök kisebbek, mint a többi potrohszelvényen, nincsenek megnagyobbodott szegélyszőrök, szternit nem látható. A második tergit elülső része az elsőhöz hasonlóan sárgás-barna, míg hátulsó szegélye fekete és megnagyobbodott szegélyszőrök találhatók rajta, melyek mérete a további szelvényeken egyre nagyobb. A második szterniten a szőrök hegyükkel hátrafelé mutatnak és a szternitlemez első harmadát egy kis kiemelkedés, az ún. „*Wheeler*-féle szerv” (*Wo*) foglalja el. A harmadik tergit alig különbözik a másodiktól, csupán hosszabbak a szegélyszőrei. A harmadik szterniten - csakúgy, mint az ezután következőkön - nincs *Wheeler*-féle szerv, a szőrök hegye körülbelül 45° -os szögben oldalra mutat. A harmadik és negyedik tergit között az a különbség, hogy az utóbbi hátsó szegélyén található fekete sáv eléri a tergit alsó szélét, míg a harmadikon előbb véget ér. Az A5 a nőstényeknél gyakorlatilag megegyezik a negyedikkel. A hímek ötödik tergitje az eddigiektől eltérően teljes szélességében fekete, az ötödik szternit kicsit szélesebb a megelőzőnél. A hatodik tergit nagy részéről hiányoznak a finom szőröcskék (trichómák) mindkét nemből. A hímek hatodik szternitje csupasz és patkó alakú, hatodik tergitjük az ötödikhez hasonlóan teljes szélességében fekete.

A hetedik tergít a nőstényeken nagyjából háromszög alakú, teljesen hiányoznak róla a trichómák és a szőrök mérete lényegesen kisebb, mint a megelőző szelvényeken. A nőstények hetedik szternitjén nincsenek trichómák, a szőrök száma kisebb, mint az előző szelvényeken, és a szőrök hegyükkel befelé fordulnak. A hímek hetedik tergítje alig látható, keskeny, szőrtelen kitinlemezzé redukálódott, hetedik szternitlemezük nincs. A nőstények nyolcadik tergítje csupán egy vékony kitinlemez, amelyen öt-hat, érzékszőrre emlékeztető szőr van. A nyolcadik szternit ún. vaginális lemezzé alakult, amelyen a szternitszőrök rövid, vastos, fogszerű képletekké módosultak. A hímeken sem nyolcadik tergít, sem nyolcadik szternit nem látható. A nőstények kilencedik potrohszelvénye hiányzik. Hímeken a kilencedik tergít ún. „genitális ívvé” (*GA*) alakult, amelyen a szőrök eltérnek a többi tergíten láthatótól: míg azok egyenesek, hosszában bordázottak és viszonylag hirtelen elvékonyodva végződnek, addig a genitális íven lévők simák, hosszan elvékonyodóak és hegyük hullámos lefutású. A kilencedik szternit a hímeken bonyolult szerkezetű külső ivarszervvé alakult. Az anális lemez - amely talán a tizedik potrohszelvénynek felel meg - mindkét nem esetében olyan szőrökkel borított, amelyek emlékeztetnek a hím genitális íven találhatóakra. Az anális lemez hímeken hosszában, nőstényeken keresztirányban kettéosztott (*Gyurkovics, 1986*). A leírtak a következő oldalon lévő **22. ábrán** láthatóak.

22. ábra. Felnőtt *Drosophila melanogaster* potrohszelvényeinek morfológiája. a=hátoldal, b=hasoldal, T=tergit, S=szternit, GA=genitális ív, VP=vaginális lemez, A=anália, St=érzékszőr, Wo=Wheeler-féle szerv (Roseland nyomán, 1976)



7.1.6. A *bithorax-komplex* szerkezete, működési modellje és szabályozása

A *bithorax-komplex* (*BX-C*) *Edward Lewis* kutatásainak köszönhetően vált ismertté. Ő izolálta az első mutációkat ebben a régióban, ő állapította meg az első szabályszerűségeket e génkomplex működésére vonatkozóan. Eredményei hatására a *BX-C* a fejlődésbiológiai és génműködés-szabályzási vizsgálatok középpontjába került. Ennek köszönhetően a *BX-C* ma már molekulárisan is teljesen ismert (*Martin és mtsai.*, 1995).

A *BX-C* a harmadik kromoszóma jobb karján, a 89E1-4 citológiai régióban található. Funkcionálisan három nagy működési egységre, doménre osztható:

1. *Ultrabithorax* (*Ubx*), mely a középtor hátsó fele és az első potrohszelvény elülső fele,
2. *abdominal-A* (*abd-A*), mely az első potrohszelvény hátulsó fele és a negyedik potrohszelvény elülső fele,
3. *Abdominal-B* (*Abd-B*), mely a negyedik potrohszelvény hátsó fele és a kilencedik potrohszelvény

által határolt testtájak normális kialakulásához szükséges (*Sanchez-Herrero és mtsai.*, 1985). Ezeket a régiókat először mutációk segítségével sikerült kijelölni, melyek, mint a fentiekből kitűnik, egyszerre több szelvény identitásbeli zavarát okozzák. E három funkcionális egységnek megfelelően a *BX-C* mintegy 300 kilobázis hosszú területén összesen három fehérjekódoló egységet, gént sikerült kimutatni (*Sanchez-Herrero és mtsai.*, 1985). Ez a három homeodomént tartalmazó

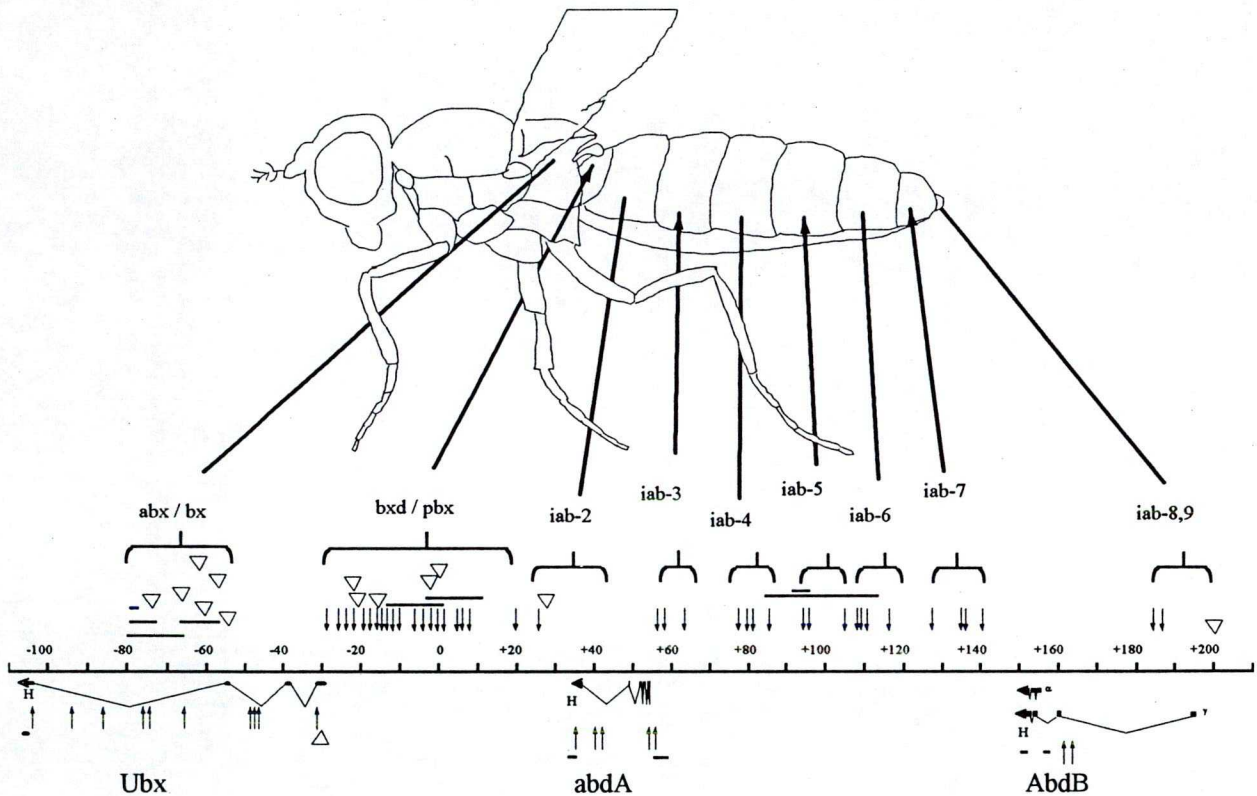
fehérje tíz, egymástól különböző szelvény kialakításáért felelős. Ez a „takarékos” megoldás azért lehetséges, mert a három gén kifejeződési szintje szelvényenként eltérő (*White* és *Wilcox*, 1984, 1985).

Ismertek olyan mutációk is a *BX-C*-ben, melyek csak egy-egy szelvény identitását változtatják meg. E mutációk következtében megváltozik az egyik fehérjének a szintje is az adott szelvényben. Ezen szelvényt specifikus mutációk által meghatározott DNS-szakaszokról nem képződik fehérje, feladatuk a velük azonos kromoszómán lévő („*cisz*”-helyzetű) és szorosan kapcsolódó három gén* működésének **pozitív** szabályozása (serkentése) (*Martinez-Arias* és *Lawrence*, 1985), ezért *cisz*-regulátor régióknak nevezik őket. Számuk megegyezik a *BX-C* által szabályozott szelvények számával, vagyis tíz *cisz*-regulátor régiót sikerült mutációk által azonosítani (*abx*, *bxd*, *iab-2*, *iab-3*, *iab-4*, *iab-5*, *iab-6*, *iab-7*, *iab-8*, *9*). A doménspecifikus fehérjék térbeli eloszlását tehát e szelvényt specifikus szabályozó elemek biztosítják.

Érdekes egybeesés, hogy a domén-/szelvényt specifikus funkciók sorrendje a kromoszómán megegyezik az általuk meghatározott testrészeknek/szelvényeknek a test hossz tengelye mentén elfoglalt sorrendjével (következő oldal, **23.** ábra).

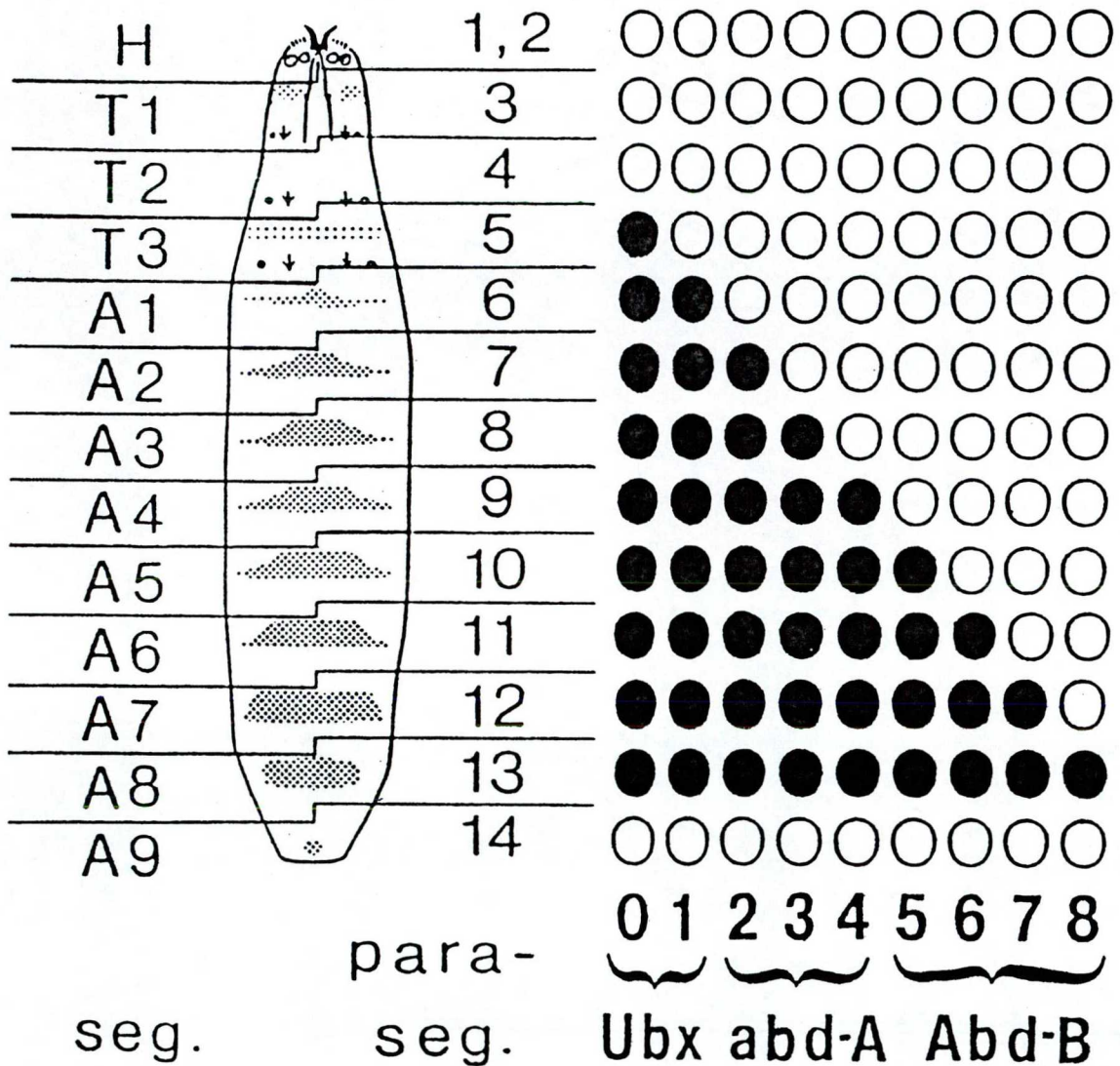
* A szakirodalomban előfordul, hogy a *bithorax-komplex* különleges szerkezete és a szabályozó régiók szokatlanul nagy (olykor több tíz kilobázis hosszú) mérete miatt a „**gén**” szót csak a kódoló szakaszra használják. A *cisz*-regulátor régiókat a kódoló résszel együtt „**domain**”-nek nevezik. A továbbiakban én is ezt a nevezéktant alkalmazom.

23. ábra. A *bithorax-komplex* szerkezete, szelvényt-specifikus szabályozás, mutációk a *BX-C*-ben. A folytonos vonal a *BX-C*-nek megfelelő 300 kb hosszú DNS-szakaszt jelképezi. Felette az egyes szelvényt-specifikus szabályozó elemek, alatta a három fehérjekódoló transzkripciós egység található. **H** a homeodoménnek megfelelő homeobox-szekvenciákat, a nyilak töréspontokat, a vízszintes vonalak deléciókat, a háromszögek pedig inszerciákat jelölnek (Peifer és mtsai., 1987).



Valószínű, hogy ez a sorrend nem a véletlen műve: ahogy haladunk a középtortól a *muslica* hossz tengelye mentén hátrafelé, minden szelvényben egy újabb cisz-regulátor elem válik aktívvá és a hátrébb lévő szelvényekben aktív is marad (Lewis, 1982, következő oldal 24. ábra).

24. ábra. A BX-C működésének Lewis-szerinti modellje (1982). A mátrix oszlopai a BX-C egy-egy cisz-regulátor régiójának (0-8), a sorok egy-egy szelvénynek illetve paraszegmentnek felelnek meg. A cisz-regulátorok inaktív állapotát az üres, az aktív állapotot pedig kitöltött karika jelképezi.

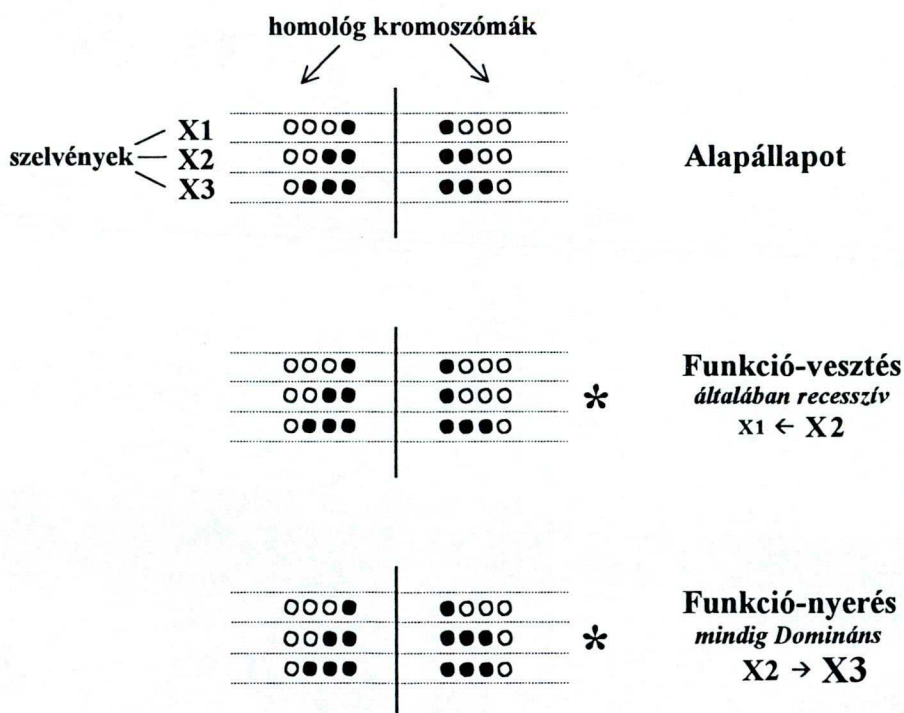


A *BX-C* „lépcsőzetes” működési elvét igazolják az ún. „funkció-vesztéses” (*loss of function*) típusú mutációk: ha például a harmadik potrohszelvény kialakításáért felelős *iab-3* elemet elrontjuk, akkor erre a mutációra homozigóta muslicáknak a második potrohszelvénye után egy újabb, a másodikkal teljesen megegyező szelvénye következik (a harmadik helyén), majd egy normális kinézetű negyedik potrohszelvény.

A *BX-C* szerkezetéből és a *Lewis*-modellből következik, hogy minden egyes szelvényben egymással szomszédos egy aktív és egy inaktív szabályozó elem. A két eltérő, diszkrét állapot autonóm fennmaradása megkívánja, hogy a szabályozó elemek valamilyen módon el legyenek választva - szigetelve - egymástól. Laboratóriumunkban sikerült két olyan kisméretű (egy illetve négy kilobázisnál kisebb) deléciót izolálni, melyek egy-egy ilyen „szigetelő” régiót távolítanak el két-két szabályozó elem közötti területről. Az *Mcp^{B116}* deléció az *iab-4* és *iab-5* régiót (*Karch* és *mtsai.*, 1994), míg a *Fab-7* deléció (*Gyurkovics* és *mtsai.*, 1990) az *iab-6* és *iab-7* régiót „forrasztja egybe”, eltávolítván a közöttük lévő szigetelő elemet, az ún. „*boundary*” régiót. Az *Mcp^{B116}* mutáció következtében az először a negyedik potrohszelvényben aktív *iab-4* elem aktiválja a normálisan csak az ötödik szelvénytől aktív *iab-5* régiót, mely így, a normálisnál egy szelvényel hamarabb, már a negyedik potrohszelvényben lehetővé teszi az *Abd-B* gén ektopikus kifejeződését. Ennek következtében a muslica negyedik potrohszelvénye ötödikké módosul, ami hímeiben igen szembetűnő: a normálisan nagyrészt sárgás-barna negyedik tergít az ötödikhez hasonlóan teljes egészében feketén pigmentált lesz. A *Fab-7* deléció

következtében az *iab-6* régió „aktív állapota” ráterjed az A6-ban még inaktív *iab-7* régióra és aktiválja azt a hatodik szelvényben. Ennek eredményeként a hatodik potrohszelvény hetedikké transzfomálódik, ami nőstényekben és hímekben egyaránt jól nyomkövethető (lásd következő fejezet). Az *Mcp* és *Fab-7* mutációt „funkció-nyeréses” (*gain of function*) mutációnak nevezik, és domináns fenotípust eredményeznek. Ezzel szemben, a cisz-regulátor régiók funkció-vesztéses mutációi általában recesszívek. Az ismertetett példákból megállapítható, hogy a két mutáció-csoport ellentétes irányú transzformációt okoz: a funkció-vesztéses mutációk esetében egy szelvény egy tőle előrébb, míg a funkció-nyeréses mutációknál egy szelvény egy tőle hátrébb elhelyezkedő szelvénné módosul (25. ábra).

25. ábra. A funkció-vesztéses és funkció-nyeréses mutációk hatásának modellezése.
●=aktív, ○=inaktív állapotú cisz-regulátor



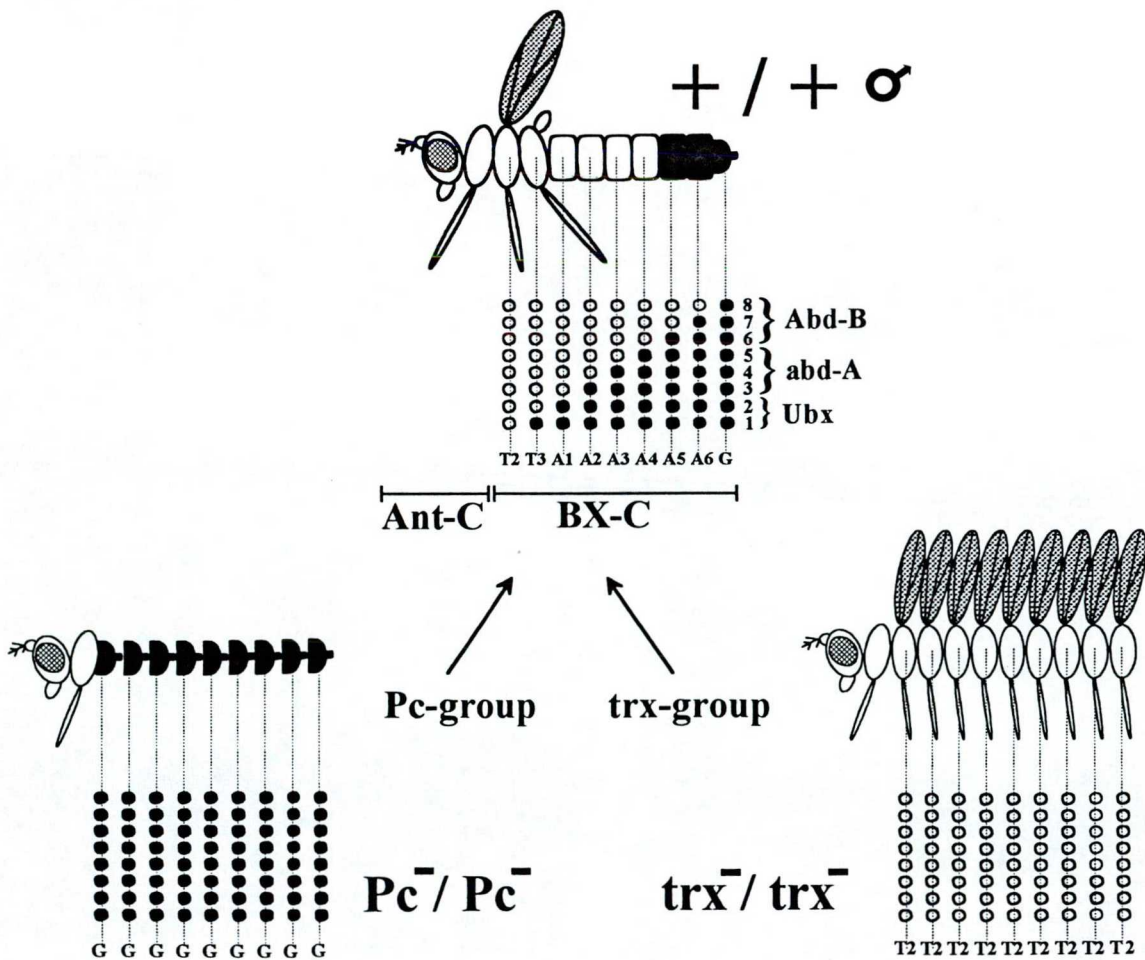
Ha az *Ubx* és az *Abd-B* gén, illetve ez utóbbi szabályozó elemei (*iab-5--iab-8,9*) csak egy kópiában vannak jelen, akkor a megfelelő testrészekben a funkció-vesztéses mutációk esetében jellemző irányú, részleges transzformációkat figyelhetünk meg (például a billér részlegesen szárnyrá, az ötödik potrohszelvény részlegesen negyedikké módosul). Ezt a jelenséget, amikor egyszeres géndózis nem elegendő a vad fenotípus kialakításához, „haploid elégtelenségnek” nevezik.

A szabályozó régiók aktivitási mintázatát a *szegmentációs gének* határozzák meg az egyedfejlődés igen korai szakaszában. Minden cisz-regulátor egyedi kombinációban tartalmazza (az enhanszer jellegű szekvenciákon kívül) a gátló hatású *gap-*, és az aktiváló hatású *pair-rule* gének termékeinek célszekvenciáit (*Busturia* és *Bienz*, 1993). Ezen gének később befejezik működésüket, de a cisz-regulátorok aktivitási mintázata fennmarad a továbbiakban is. Ezt gének két, egymással ellentétes hatású csoportja, a *Polycomb-* és *trithorax-group* tagjai biztosítják (*Paro*, 1990), melyek szintén képesek kötődni a szabályozó régiók egy-egy szakaszához. A *Polycomb-group* (*Pc-G*) tagjai negatív regulátorok, feladatuk az inaktív állapot megőrzése ott, ahol szükséges: amennyiben például a *Polycomb* gén terméke hiányzik, akkor a cisz-regulátorok állapota kezdetben a normális mintázatot tükrözi, később azonban ez a mintázat felborul és minden regulátor elem mindegyik szelvényben aktívvá válik. Ennek következtében a homozigóta *Polycomb* mutáns embriók minden testszelvénye az utolsó szelvényhez hasonlít. Ha nem pusztulnának el embrionális korban és megérnék a felnőtt állapotot, akkor az összes szelvényük genitális szelvényé módosulna (121. oldal,



26. ábra). A *trithorax*-group (*trx-G*) géneinek hatása pont ellentétes, feladatuk az aktív állapot fenntartása. Hiányukban a kezdetben szintén normális mintázat eltűnik és minden regulátor szakasz inaktiválódik. Ezt is jellegzetes fenotípusos változás követi: az összes szelvény a *BX-C* által szabályozott első szelvény (harmadik torszelvény) előtt lévővé (második torszelvény) módosul. (Ehhez hasonló fenotípust eredményez egyébként a *Df(3R)P9* deléció, mely teljesen eltávolítja a *bithorax*-komplexet.) Ha nem pusztulna el a homozigóta *trx* mutáns embrionális állapotban, akkor a felnőtt légy minden szelvényén egy-egy pár szárny lenne (26. ábra).

26. ábra. A *Pc-G* és *trx-G* gének működésének szemléltetése. ●=aktív, ○=inaktív állapotú cisz-regulátor (egyszerűsített ábra).



Mivel a gátló hatású *Polycomb*- és az aktiváló hatású *trithorax*-csoport tagjai a *bithorax-komplex* területén kívül esnek, a *BX-C* „transz-regulátorainak” is szokták nevezni őket.

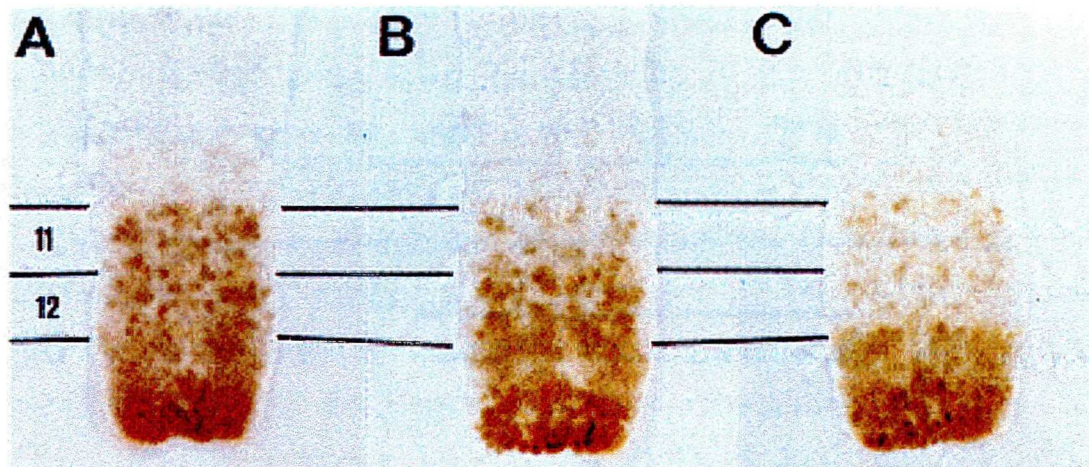
7.1.7. Az *Abd-B* domén működése, a *Fab-7* és az *iab-7^{Sz}* mutáció

Az értekezésemben leírt transzvektációs jelenséget a *bithorax-komplex Abd-B* doménjében mutattuk ki a *Fab-7* mutáció segítségével. Ez indokoltá teszi, hogy kicsit részletesebben ismertessem az *Abd-B* domén működését két - a hatodik illetve a hetedik potrohszelvény identitását megváltoztató - mutáció révén.

Az *Abd-B* gén által kódolt négy különböző fehérje (*Zavortnik* és *Sakonju*, 1989) funkció alapján két egységet alkot. Három, egymástól kismértékben eltérő fehérje (class B, C és γ) együtt látja el az ún. „*r*” funkciót, mely a kilencedik potrohszelvény kialakításához szükséges. A negyedik fehérje (class A) az ötödiktől a nyolcadik potrohszelvényig terjedő testrészek meghatározásához szükséges. Ez az ún. „*m*” funkció (*Casanova* és *mtsai.*, 1986). Az utóbbi fehérje a különböző szelvényekben nem egyforma mennyiségben fordul elő: az ötödik potrohszelvényben csak egészen kicsi, a hatodikban, hetedikben és nyolcadikban egyre növekvő mennyiségben mutatható ki (*Celniker* és *mtsai.*, 1989, illetve **123.** oldal, **27/b** ábra). Ennek a négy szelvénynek a jellegét tehát az *Abd-B m* géntermék mennyiségi különbségei határozzák meg. (A negyedik és az ennél előrébb elhelyezkedő potrohszelvényekben egyáltalán nincs *Abd-B* géntermék, itt az *abd-A* határozza meg a

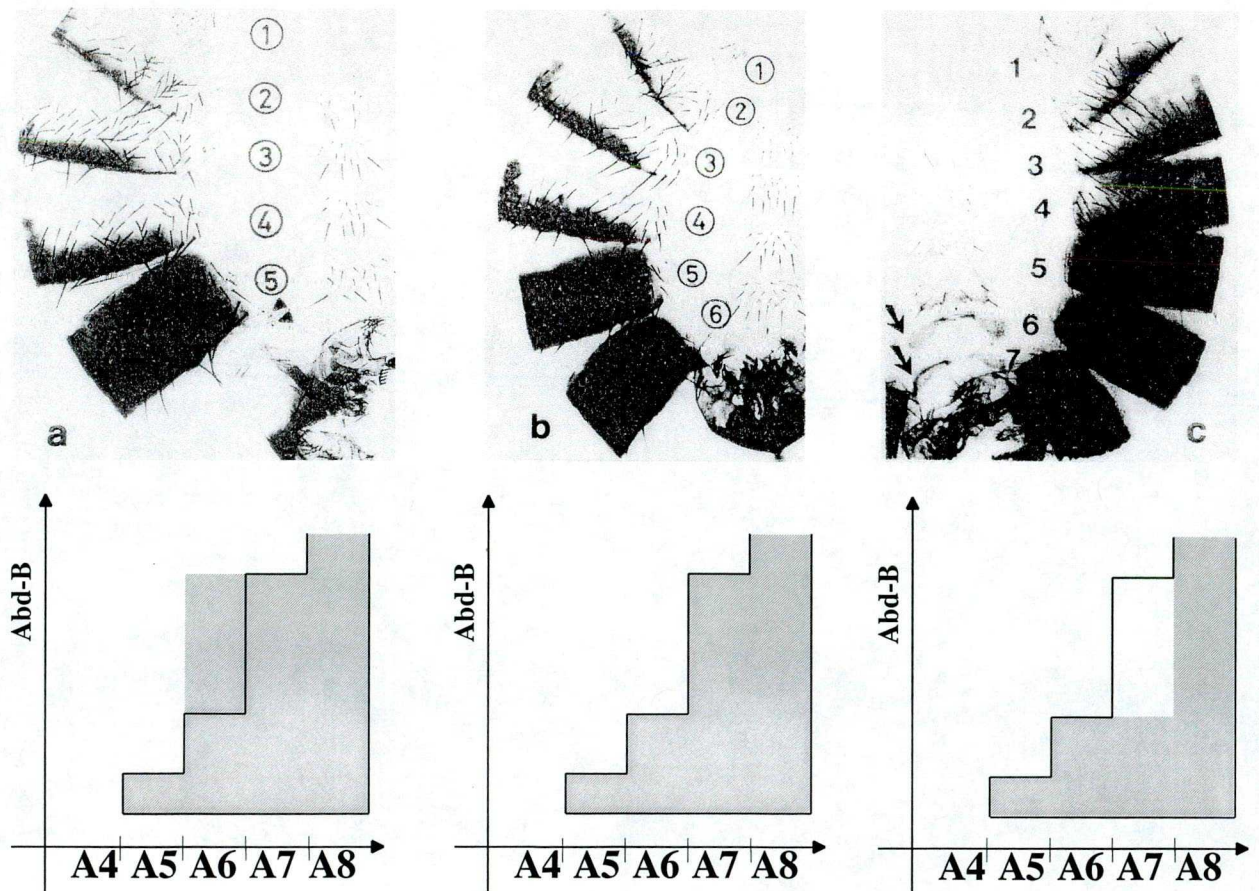
szelvények tulajdonságait). A *BX-C* két másik génjéhez hasonlóan az *Abd-B* gén kifejeződési szintjét is minden egyes szelvényben egy arra a szelvényre nézve specifikus cisz-regulátor elem állítja be: az ötödik potrohszelvényben (A5) az *infraabdominal-5* (*iab-5*), az A6-ban az *iab-6*, és így tovább a kilencedik potrohszelvényig. A cisz-regulátorok szelvény-specifikus működését jól tanulmányozhatjuk két eltérő hatású mutáció segítségével. Ha az *iab-7* elemet eltávolító *iab-7^{Sz}* mutáció (Galloni és mtsai., 1993) hatását vizsgáljuk homozigóta állapotban, azt tapasztaljuk, hogy az A7-ben (PS12) az *Abd-B* fehérje mennyisége visszaesik arra a szintre, amely az A6-ra (PS11) jellemző, miközben sem az utóbbi szelvényben, sem az A8-ban nem változik a géntermék mennyisége (27/c ábra). A *Fab-7* mutáció (Gyurkovics és mtsai., 1990) következtében az *iab-7* régió már az A6-ban (PS11) aktívvá válik, ezért a homozigóta *Fab-7* embriók hatodik abdominális szelvényében az *Abd-B* fehérje szintje már olyan magas, mint amilyen normálisan az A7-re jellemző (27/a ábra).

27. ábra. Az *ABD-B* fehérje expressziós mintázata embrionális központi idegrendszerben. (A) *Fab-7* homozigóta, (B) vad (+/+), és (C) *iab-7^{Sz}* homozigóta. Az ábrán fel van tüntetve az A6 (PS11) és A7 (PS12) pozíciója. (Galloni és mtsai., 1993)



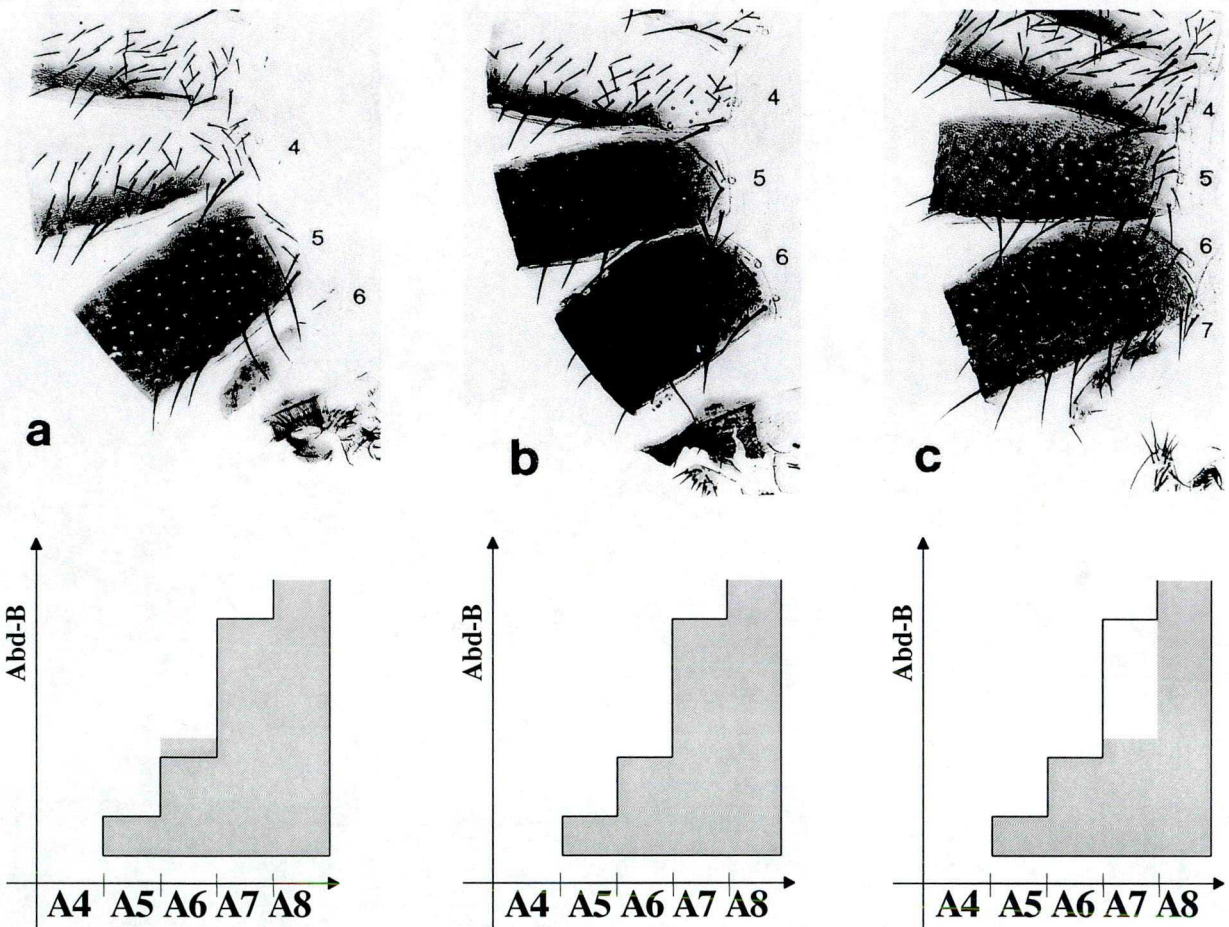
Ennek megfelelően az *iab-7^{Sz}* delécióát homozigóta állapotban hordozó muslicák hetedik potrohszelvénye hatodikká alakul át, míg a többi szelvény változatlan marad. A mutáció hatása igen látványos: a homozigóta hímeknek látszólag eggyel több szelvénye lesz (**28/c** ábra), ugyanis normálisan az A7 a hímekben nem képez kutikulát (**28/b** ábra). A *Fab-7* mutáció pont ellentétes irányú transzformációt okoz: a hatodik potrohszelvényt alakítja hetedikké, aminek következtében a *Fab-7* homozigóta hímeknek eggyel kevesebb látható szelvénye lesz, „eltűnik” a hetedikké transzformált hatodik potrohszelvény (**28/a** ábra).

28. ábra. Adult kutikula-készítmények (a) *Fab-7* homozigóta, (b) vad (+/+), (c) *iab-7^{Sz}* homozigóta hímekből. A nyilak az ismétlődő szelvényekre mutatnak (*Gyurkovics és mtsai.*, 1990, *Galloni és mtsai.*, 1993). A képek alatti rajzokon a fekete vonal által határolt terület a vad, a sávozott pedig a tényleges szelvényenkénti *Abd-B* géntermék szintet jelöli.



Mindkét mutáció heterozigóta állapotban is domináns fenotípust okoz: a *Fab-7* azért, mert funkció-nyeréses, a funkció-vesztéses *iab-7^{Sz}* mutáció pedig az *Abd-B* doménre jellemző haploid elégtelenség miatt. Az *iab-7^{Sz}/+* heterozigóták A7-jében az *Abd-B* géntermék szintje a vad (+/+) A6-nak és A7-nek megfelelő szintek közé esik, melyet jól tükröz az *iab-7^{Sz}/+* heterozigóták „köztes” fenotípusa is: egy keskeny, feketén pigmentált csökevényes tergitlemez figyelhető meg a hímek hatodik potrohszelvénye után (következő oldal, **29/c** ábra). Pontosan ilyen csökevényes a *Fab-7/+* heterozigóta hímek hatodik szelvénye (következő oldal, **29/a** ábra), ugyanis ebben a szelvényben is csak egy kópia *iab-7* működik (a hetedik szelvény normális - azaz nem látható -, ott már mindkét *iab-7* régió aktív). Vagyis az *iab-7^{Sz}/+* heterozigóta hímek csökevényes hetedik, illetve a *Fab-7/+* heterozigóta hímek csökevényes hatodik szelvénye azért hasonló, mert azonos bennük az *Abd-B* géntermék szintje. Továbbá az is megállapítható, hogy az egymást követő szelvényekben az *Abd-B* géntermék szintje több, mint duplájával nő (következő oldal, **29.** ábra).

29. ábra. Adult kutikula-készítmények (a) *Fab-7*⁺, (b) vad (*+/+*) és (c) *iab-7^{Sz}/+* heterozigóta hímekből. A képek alatti rajzokon a fekete vonal által határolt terület a vad, a sávozott pedig a tényleges szelvényenkénti *Abd-B* géntermék szintet jelöli.



7.1.8. A *Drosophila*-genetikában használt alléltípusok

A Müller-féle nevezéktant (1932) gyakran használják a *Drosophila*-genetikában, különösen a homeotikus gének esetében. Attól függően, hogy a különböző mutáns allélok fenotípusa hogyan változik a kérdéses gént átfedő delécióval illetve duplikációval szemben, a következő alléltípusokat lehet elkülöníteni: *amorf*, *hipomorf*, *hipermorf*, *antimorf* és *neomorf*.

Amorf allél esetében nincs aktív géntermék. Ennek részhalmazába tartozik a *null* allél, amikor egyáltalán nem képződik RNS illetve fehérje. A *hipomorf* allél a normálisnál kisebb, a *hipermorf* pedig a normális (vad) allélnál nagyobb aktivitással rendelkezik. (Ez utóbbi esetben vagy a fehérje mennyisége, vagy a fehérje aktivitása nőtt meg.) Ennek megfelelően azonos erősségű mutáns fenotípust kapunk akkor, ha az *amorf* allél homozigóta állapotban van jelen, vagy ha az *amorf* allél egy delécióval van szemben. A *hipomorf* allél delécióval szemben erősebb mutáns fenotípust eredményez, mint amit homozigóta állapotban láthatunk. A *hipermorf* allélek okozta fenotípus duplikációval szemben erősödik, delécióval szemben gyengül, közelít a vad fenotípushoz. Az *antimorf* allél terméke kölcsönhatásba lép a vad típusú géntermékkel, azt elrontja, „mérgezi”. (Ilyen jelenség például dimer illetve multimer fehérjetermék esetében fordulhat elő.) Ezzel összhangban a fenotípus duplikációval szemben közelít a normálishoz, delécióval szemben pedig tovább erősödik. A *neomorf* allél hatását a normális alléltól eltérő úton, időben vagy helyen fejt ki, ezért érthető, hogy fenotípusa sem duplikációval, sem delécióval szemben nem változik. A *hipermorf*, *antimorf* és *neomorf* allélek általában dominánsak, míg a *hipomorf* és *amorf* allélek általában recesszívek. (Kivétel ez alól a „haploid elégtelenség” jelensége, amikor egyszeres géndózis nem elegendő a vad fenotípus kialakításához.) Az *amorf* és *hipomorf* allélek „funkció-vesztéses”, a *hipermorf* és *neomorf* allélek pedig „funkció-nyeréses” típusú mutációknak tekinthetők. (Bizonyos értelemben ide sorolhatók az *antimorf* allélek is.)

8. KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

1. J. Vasquez, G. Farkas, M. Gaszner, A. Udvardy, M. Muller, K. Hagstrom, H. Gyurkovics, **L. Sipos**, J. Gausz, M. Galloni, I. Hogga, F. Karch, and P. Schedl, (1993) Genetic and Molecular Analysis of Chromatin Domains. *Cold Spring Harbour Symposia Quant. Biol.* **58**, 45-54

Impakt faktor (1996): 1.958

2. Karch, F., M. Galloni, **L. Sipos**, J. Gausz, H. Gyurkovics, and P. Schedl (1994) *Mcp* and *Fab-7*: molecular analysis of putative boundaries of *cis*-regulatory domains in the bithorax complex of *Drosophila melanogaster*. *Nucleic Acids Research* **22**, 3138-3146

Impakt faktor (1996): 4.488

3. J. Mihály, I. Hogga, S. Barges, M. Galloni, R. K. Mishra, K. Hagstrom, M. Muller, P. Schedl, **L. Sipos**, J. Gausz, H. Gyurkovics and F. Karch (1998) Chromatin domain boundaries in the Bithorax complex. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* (volt *Experientia*) **54**, 60-70

Impakt faktor (1996): 1.476

4. **Sipos, L.**, J. Mihály, F. Karch, P. Schedl, J. Gausz and H. Gyurkovics (1998) Transvection in the *Drosophila Abd-B* domain: Extensive upstream sequences are involved in anchoring of distant *cis*-regulatory regions to the promoter. *Genetics*, közlésre elfogadva

Impakt faktor (1996): 4.928

Összimpakt faktor: 12.85

8. KÖZLEMÉNYEK JEGYZÉKE

J. Vasquez, G. Farkas, M. Gaszner, A. Udvardy, M. Muller, K. Hagstrom, H. Gyurkovics, **L. Sipos**, J. Gausz, M. Galloni, I. Hogga, F. Karch, and P. Schedl, (1993) Genetic and Molecular Analysis of Chromatin Domains. *Cold Spring Harbour Symposia Quant. Biol.* **58**, 45-54

Karch, F., M. Galloni, **L. Sipos**, J. Gausz, H. Gyurkovics, and P. Schedl (1994) *Mcp* and *Fab-7*: molecular analysis of putative boundaries of *cis*-regulatory domains in the bithorax complex of *Drosophila melanogaster*. *Nucleic Acids Research* **22**, 3138-3146

Sipos, L., J. Mihály, F. Karch, J. Gausz and H. Gyurkovics (1997) Transvection in the *Drosophila Abd-B* domain: extensive upstream sequences are involved in the anchoring of distant *cis*-regulatory regions to the promoter. *Genetics*, közlésre benyújtva

9. IRODALOMJEGYZÉK

- ABELES, A.L. and S.J. AUSTIN, 1991 Antiparalell plasmid-plasmid pairing may control P1 plasmid replication, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**: 9011-9015
- ARNOLDUS, E.P.J., A.C.B. PETERS, G.T.A.M. BOTS, A.K. RAAP and M. VAN DER PLOEG, 1989 Somatic pairing of chromosome 1 centromeres in interphase nuclei of human cerebellum, *Hum. Genet.* **83**: 231-234
- ASHBURNER, M., 1967 Gene activity dependent on chromosome synapsis in the polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster*, *Nature*, **214**: 1159-1160
- ASHBURNER, M., 1977 Happy birthday - puffs! *Chromosomes Today*, **6**: 213-22
- ASHBURNER, M., 1989a *Drosophila: A LABORATORY HANDBOOK*, Cold Spring Harbor Laboratory Press
- ASHBURNER, M., 1989b *Drosophila: A LABORATORY MANUAL*, Cold Spring Harbor Laboratory Press
- BABU, P. and S.G. BHAT, 1980 Effects of zeste on white complementation. In "Development and Neurobiology of *Drosophila*" (eds. O. SIDDIQI, P. BABU, L.M. HALL and J.C. HALL), pp. 35-38, Plenum, New York
- BABU, P., K.S. SELVAKUMAR and S. BHOSEKAR, 1987 Studies on transvection at the bithorax complex in *Drosophila melanogaster*, *Mol. Gen. Genet.*, **210**: 557-563
- BATESON, W., 1894 *Materials for the Study of Variation Treated with Especial Regards to Discontinuity in the Origin of Species*, Macmillan, London
- BEERMAN, W., 1952 Chromometenkoustanze und spezifische Modifikationen der Chromosomenstruktur un der Entwicklung und Organdifferenzierung von *Chironomus tentans*, *Chromosoma*, **5**: 139-198
- BENDER, W., M. AKAM, F. KARCH, P.A. BEACHY, M. PEIFER, P. SPIERER, E.B. LEWIS and D.S. HOGNESS, 1983 Molecular genetics of the bithorax complex in *Drosophila melanogaster*, *Science* **221**: 23-29
- BENDER, W., B. WEIFFENBACH, KARCH, F., M. PEIFER, 1985 Domains of cis-interaction in the Bithorax Complex, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **50**: 173-180

- BENSON, M. and V. PIROTTA, 1987 The product of the *Drosophila zeste* gene binds to specific DNA sequences in *white* and *Ubx*, *EMBO J.*, **6**: 1387-1392
- BENSON, M. and V. PIROTTA, 1988 The *Drosophila zeste* protein binds cooperatively to sites in many gene regulatory regions: Implications for transvection and gene regulation, *EMBO J.*, **7**: 3907-3915
- BERENDES, H.D., 1970 Polytene chromosome structure at the submicroscope level, *Chromosoma*, **29**: 118-130
- BIGGIN, M.D., S. BICKEL, M. BENSON, V. PIROTTA and R. TJIAN, 1988 *Zeste* encodes a sequence-specific transcription factor that activates the *Ultrabithorax* promoter in vitro, *Cell* **53**: 713-722
- BITTER, M.A., M.E. NEILLY, M.M. LE BEAU, M.G. PEARSON and J.D. ROWLEY, 1985 Rearrangements of chromosome 3 involving bands 3q21 and 3q26 are associated with normal or elevated platelet counts in acute nonlymphocytic leukemia, *Blood*, **66**: 1362-1370
- BOLLMANN, J., R. CARPENTER and E.S. COEN, 1991, Allelic interactions at the *nivea* locus of *Antirrhinum*, *Plant Cell*. **3**: 1327-1336
- BOSSY, B., L.M.C. HALL and P. SPIERER, 1984 Genetic activity along 315 kb of the *Drosophila* chromosome, *EMBO J.*, **3**: 2537-2541
- BOULET, A.M., A. LLOYD and S. SAKONJU, 1991 Molecular definition of the morphogenetic and regulatory functions and the *cis*-regulatory elements of the *Drosophila Abd-B* gene, *Development* **111**: 393-405
- BRIDGES, C.B., 1935 Salivary chromosome maps with a key to the banding of the chromosomes of *D. melanogaster*, *J. Hered.*, **26**: 60-64
- BULL, A., 1966 *Bicaudal*, a genetic factor which affects the polarity of the embryo in *Drosophila melanogaster*, *J. Exp. Zool.*, **161**: 221-241
- BUSTURIA, A. and M. BIENZ, 1993 Silencers in *Abdominal-B*, a homeotic *Drosophila* gene, *EMBO J.*, **12**: 1415-1425
- CARTER, K.C., K.L. TANEJA and J.B. LAWRENCE, 1991, Discrete nuclear domains of poly(A) RNA and their relationship to the functional organization of the nucleus, *J. Cell Biol.*, **115**: 1191-1202
- CASANOVA, J., G. MORATA, E. SÁNCHEZ-HERRERO, 1985 *Contrabithorax* and the Control of Spatial Expression of the Bithorax Complex Genes of *Drosophila*, *J. EMBRYOL. EXP. MORPHOL.*, **90**: 179-196

- CASANOVA, J., E. SÁNCHEZ-HERRERO and G. MORATA, 1986 Identification and characterization of a parasegment specific regulatory element of the *Abdominal-B* gene of *Drosophila*, *Cell*, **47**: 627-636
- CASTELLI-GAIR, J. E., J.-L. MICOL and A. GARCIA-BELLIDO, 1990 A *Cbx¹* Mutant Allele Induces Ectopic Expression of a Normal Allele in *Trans*, *Genetics*, **126**: 177-184
- CELNIKER, S.E., D.J. KEELAN and E.B. LEWIS, 1989 The molecular genetics of the bithorax complex of *Drosophila*: characterization of the products of the *Abdominal-B* domain, *Genes Dev.*, **3**: 1424-1436
- CELNIKER, S.E., S. SHARMA, D.J. KEELAN and E.B. LEWIS, 1990 The molecular genetics of the bithorax complex of *Drosophila*: *cis*-regulation in the *Abdominal-B* domain, *EMBO J.*, **9**: 4277-4286
- DANEHOLT, B., 1975 Transcription in polytene chromosomes, *Cell*, **4**: 1-9
- DINGWALL, A.K., S.J. BEEK, C.M. McCALLUM, J.W. TAMKUM, G.V. KALPANA, S.P. GOFF and M.P. SCOTT, 1995 The *Drosophila snr1* and *brm* Proteins Are Related to Yeast SWI/SNF Proteins and Are Components of a Large Protein Complex, *Mol. Biol. Cell*, **6**: 777-791
- DREESEN, T.D., S. HENIKOFF and K. LOUGHNEY, 1991 A pairing-sensitive element *Genes. Dev.* **5**: 331-340
- DU PRAW, E.J. and G.F. BAHR, 1969 The arrangement of DNA in human chromosomes as investigated by quantitative electron microscopy, *Acta Cytol.*, **13**: 188-192
- DUBINYIN, N.P. and B.N. SIDOROV, 1934 Relation between the effect of a gene and its position in the system, *Am. Nat.*, **68**: 377-381
- DUNCAN, I., 1982 Polycomblike: a gene that appears to be required for the normal expression of the bithorax and Antennapedia gene complexes of *Drosophila melanogaster*, *Genetics*, **102**: 49-70
- ELFRING, L.K., R. DEURING, C.M. McCALLUM, C.L. PETERSON, J.W. TAMKUM, 1994 Identification and characterization of *Drosophila* relatives of the yeast transcriptional activator SNF2/SWI2, *Mol. Cell. Biol.*, **14**: 2225-2234
- EVANS, H.J., 1977 Human cytogenetics: molecular aspects, in: Human Genetics, ed. S. Armendares, R. Lisker, *Excerpta Medica*, 82-97

- FRANKE, A., M. DeCAMILLIS, D. ZINK, N. CHENG, H.W. BROCK and R. PARO, 1992 *Polycomb* and *polyhomeotic* are constituents of a multimeric protein complex in chromatin of *Drosophila melanogaster*, *EMBO J.*, **11**: 2941-2950
- GALLONI, M., H. GYURKOVICS, P. SCHEDL and F. KARCH, 1993 The bluetail transposon: evidence for independent *cis*-regulatory domains and domain boundaries in the bithorax complex, *EMBO J.*, **12**: 1087-1097
- GANS, M., 1949 "zeste" (z): Mutation liée au sexe et limitée par le sexe chez *Drosophila melanogaster*. I. Étude génétique de z mécanisme de la limitation par le sexe, *Bull. Biol. Fr. Belge* **83**: 136-157
- GANS, M., 1953 Étude génétique et physiologique du mutant z de *Drosophila melanogaster*, *Bull. Biol. Fr. Belge* (suppl.) **38**: 1-90
- GARCIA-BELLIDO, A., 1977 Homeotic and atavic mutations in insects, *Am. Zool.*, **17**: 613-629
- GAUSZ, J., G. BENCZE, H. GYURKOVICS, M. ASHBURNER, D. ISH-HOROWICZ, J.J. HOLDEN, 1979 Genetic characterization of the 87C region of the third chromosome of *D. melanogaster*, *Genetics*, **93**: 917-934
- GEHRING, W.J. and Y. HIROMI, 1986 Homeotic genes and the homeobox, *Annu. Rev. Genet.*, **20**: 147-173
- GELBART, W.M. and C.-t. Wu, 1982 Interactions of zeste mutations with loci exhibiting transvection effects in *Drosophila melanogaster*, *Genetics*, **102**: 179-189
- GERMAN, J., 1974 In *Chromosomes and Cancer*, J. GERMAN, ed. (New York: John Wiley & Sons), pp. 601-617
- GEYER, P.K., M.M. GREEN and V.G. CORCES, 1990 Tissue-specific Transcriptional Enhancers May Act in *Trans* on the Gene Located in the Homologous Chromosome: The Molecular Basis of Transvection in *Drosophila*, *EMBO J.*, **9**: 2247-2256
- GLOOR, H., 1954 Phänotypus der Heterozygoten bei der unvollständig dominanten, homozygot lethalen mutante *kr* (=krüppel) von *Drosophila melanogaster*, *Arch. Klaus-Stift. VererbForsch.*, **29**: 277-287
- GOLDBERG, M.L., R.A. COLVIN and A.F. MELLIN, 1989 The *Drosophila zeste* locus is nonessential, *Genetics*, **123**: 145-155

- GOLDSBOROUGH, A.S. and T.B. KORNBERG, 1996 Reduction of transcription by homologue asynapsis in *Drosophila* imaginal discs, *Nature*, **381**: 807-810
- GYURKOVICS, H., 1986 A bithorax komplex Abd-B doménjének genetikai analízise *Drosophila melanogaster*-ben, kandidátusi disszertáció (kézirat)
- GYURKOVICS, H., J. GAUSZ, J. KUMMER and F. KARCH, 1990 A new homeotic mutation in the *Drosophila* bithorax complex removes a boundary separating two domains of regulation, *EMBO J.*, **9**: 2579-2585
- HENDRICKSON, J.E. and S. SAKONJU, 1995 *Cis* and *Trans* Interactions Between the *iab* Regulatory Regions and *abdominal-A* and *Abdominal-B* in *Drosophila melanogaster*, *Genetics*, **139**: 835-848
- HENIKOFF, S. and T.D. DREESEN, 1989 Trans-inactivation of the *Drosophila* brown gene: Evidence for transcriptional repression and somatic pairing dependence, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**: 6704-6708
- HIRAOKA, Y., A.F. DERNBURG, S.J. PARMELEE, M.C. Rykowski, D.A. AGARD and J.W. SEDAT, 1993 The onset of homologous chromosome pairing during *Drosophila melanogaster* embryogenesis, *J. Cell Biol.*, **120**: 591-600
- HOPMANN, R., D. DUNCAN and I. DUNCAN, 1995 Transvection in the *iab-5,6,7* Region of the Bithorax Complex of *Drosophila*: Homology Independent Interactions *in trans*, *Genetics*, **139**: 815-833
- JACK, J.W. and B.H. JUDD, 1979 Allelic pairing and gene regulation: a model for the *zeste-white* interaction in *Drosophila melanogaster*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**: 1368-1372
- JAMRICH, M., A.L. GREENLEAF and E.K.F. BAUTZ, 1977 Localization of RNA polymerase in polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**: 2079-2083
- JONES, R.S. and W.M. GELBART, 1990 Genetic analysis of the *Enhancer of zeste* locus and its role in gene regulation in *Drosophila melanogaster*, *Genetics*, **126**: 185-199
- JUDD, B.H., M.W. SHEN and T.C. KAUFMAN, 1972 The anatomy and function of a segment of the X chromosome of *D. melanogaster*, *Genetics*, **71**: 139-156
- JUDD, B.H., 1979 Allelic complementation and transvection in *Drosophila melanogaster*, *ICN-UCLA Symp. Mol. Cell Biol.*, **15**: 107-115

- JÜRGENS, G., E. WIESCHAUS, C. NÜSSLEIN-VOLHARD and H. KLUDING, 1984 Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster*, II. Zygotic loci on the third chromosome, *Wilhelm Roux's Arch. Dev. Biol.*, **183**: 283-295
- JÜRGENS, G., 1985 A group of genes controlling the spatial expression of the bithorax complex in *Drosophila*, *Nature*, **316**: 153-155
- KALISCH, W.-E. and B. RASMUSON, 1974 Changes of zeste phenotype induced by autosomal mutations in *Drosophila melanogaster*, *Hereditas*, **78**: 97-103
- KARCH, F., B. WEIFFENBACH, M. PEIFER, W. BENDER, I. DUNCAN, S. CELNIKER, M. CROSBY and E.B. LEWIS, 1985 The Abdominal Region of the Bithorax Complex, *Cell*, **43**, 81-96
- KARCH, F. M. GALLONI, L. SIPOS, J. GAUSZ, H. GYURKOVICS and P. SCHEDL, 1994 *Mcp* and *Fab-7*: Molecular Analysis of Putative Boundaries of *Cis*-Regulatory Domains in the Bithorax Complex of *Drosophila melanogaster*, *Nucl. Acids Res.*, **22**: 3138-3146
- KAUFMAN, T.C., S.E. TASAKA and D.T. SUZUKI, 1973 The interaction of two complex loci *zeste* and *bithorax* in *Drosophila melanogaster*, *Genetics*, **75**: 299-312
- KITTEL, B.L. and D.R. HELINSKI, 1991 Interon inhibition of plasmid RK2 replication *in vitro*: Evidence for intermolecular coupling of replication origins as a mechanism for RK2 replication control, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**: 1389-1393
- LAIRD, C., 1990 Proposed genetic basis of Huntington's disease, *Trends Genet.*, **6**: 242-247
- LAWRENCE, P.A. and S.M. GREEN, 1979 Cell Line in the Developing Retina of *Drosophila*, *Dev. Biol.*, **71**: 142-152
- LE BEAU, M.M., R.A. LARSON, M.A. BITTER, J.W. VARDIMAN *et al.*, 1983 Association of an inversion of chromosome 16 with abnormal marrow eosinophils in acute myelomonocytic leukemia. A unique cytogenetic-clinico-pathological association, *N. Engl. J. Med.*, **309**: 630-636
- LEMEUNIER, F. and M. Ashburner, 1984 Studies on the evolution of the *melanogaster* species subgroup of the genus *Drosophila* (*Sophophora*). IV. The chromosomes of the two new species, *Chromosome*, **89**: 343-351

- LEONHARDT, H., A.W. PAGE, H.-U. WEIER and T.H. BESTOR, 1992 A targeting sequence directs DNA methyltransferase sites of DNA replication in mammalian nuclei, *Cell*, **71**: 865-873
- LEWIS, E.B., 1954 The theory and application of a new method of detecting chromosomal rearrangements in *Drosophila melanogaster*, *Am. Nat.*, **88**: 225-239
- LEWIS, E.B., 1982 Control of body segment differentiation in *Drosophila* by the bithorax gene complex, In: *Embryonic Development: Genes and cells*, pp. 269-288, ed. M. Burger, New York, Liss
- LINDSLEY, D.L. and E.H. ZIMM, 1992 *The Genome of Drosophila melanogaster*, Academic Press, San Diego
- LIU, C.P. and J.K. LIM, 1975 Complementation analysis of methyl methanesulfonate induced recessive lethal mutations in the zeste-white region of the X-chromosome of *Drosophila melanogaster*, *Genetics*, **79**: 601-611
- LOHS-SCHARDIN, M., 1982 *Dicephalic* - A *Drosophila* mutant affecting polarity in follicle cell organization and embryonic patterning, *Roux's Arch. Dev. Biol.*, **191**: 28-36
- LYON, M.F., 1961 Gene action in the X-chromosome of the mouse, *Nature*, **190**: 372-373
- MANSUKHANI, A., A. CRICKMORE, P.W. SHERWOOD and M.L. GOLDBERG, 1988 DNA-binding properties of the *Drosophila melanogaster* zeste gene product, *Mol. Cell. Biol.*, **8**: 615-623
- MARTIN, C.H., C.A. MAYEDA, C.A. DAVIS, C.L. ERICSSON, J.D. KNAFELS, D.R. MATHOG, S.E. CELNIKER, E.B. LEWIS and M.J. PALAZZOLO, 1995 Complete sequence of the bithorax complex of *Drosophila*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**: 8398-8402
- MARTINEZ-ARIAS, A. and P.A. LAWRENCE, 1985 Parasegments and compartments in the *Drosophila* embryo, *Nature*, **313**: 639-642
- MARTINEZ-LABORDA, A., A. GONZÁLES-REYES and G. MORATA, 1992 *Trans* regulation in the *Ultrabithorax* gene of *Drosophila*: alterations in the promoter enhance transvection, *EMBO J.*, **11**: 3645-3652
- McCALL, K., M.B. O'CONNOR and W. BENDER, 1994 Enhancer Traps in the *Drosophila* Bithorax Complex Mark Parasegmental Domains, *Genetics*, **138**: 387-399

- McGINNIS, W., M.S. LEVINE, E. HAFEN, A. KURIOWA and W. GEHRING, 1984a
A conserved DNA sequence in homeotic genes of the *Drosophila*
Antennapedia and *bithorax* complexes, *Nature*, **308**: 428-433
- McGINNIS, W., R.L. GARBER, J. WIRZ, A. KUROIWA and W.J. GEHRING, 1984b
A Homologous Protein-Coding Sequence in *Drosophila* Homeotic Genes and
Its Conservation in Other Metazoans, *Cell*, **37**: 403-408
- MESSER, S., A. FRANKE and R. PARO, 1992 Analysis of the functional role of the
Polycomb chromo domain in *Drosophila melanogaster*, *Gen. Dev.*, **6**:
1241-1254
- METZ, C.W., 1916 Chromosome studies on the Diptera: II. The paired association of
chromosomes in the Diptera, and its significance, *J. Exp. Zool.* **21**: 213-279
- MICOL, J.L. and A. GARCÍA-BELLIDO, 1988 Genetic analysis of "transvection"
effects involving *Contrabithorax* mutations in *Drosophila melanogaster*, *Proc.*
Natl. Acad. Sci. USA, **85**: 1146-1150
- MONK, M., 1990 Variation in epigenetic inheritance, *Trends Genet.*, **6**: 110-114
- MORGAN, T.H., C.B. BRIDGES and J. SCHULTZ, 1937 Constitution of the germinal
materials in relation to heredity, *Carnegie Inst. Wash. Yrbk.*, **36**: 298-305
- MÜLLER, H.J., 1930 Types of visible variations induced by X-rays in *Drosophila*, *J.*
Genet., **22**: 299-334
- MÜLLER, H.J., 1932 Further studies on the nature and causes of gene mutations,
Proc. 6th Int. Congr. Genet. (Ithaca) **1**: 213-255
- NAGL, W., 1969 Banded polytene chromosomes in the legume *Phaseolus vulgaris*,
Nature, **21**: 70-71
- NÖTHIGER, R., T. SCHÜPBACH, J. SZABAD and E. WIESCHAUS, 1978 Stem cells
and tissue homeostasis in insect development, In: *Stem Cells and Tissue*
Homeostasis, *British Soc. Cell Biol.*, pp. 71-85, Cambridge Univ. Press,
Cambridge
- NÜSSLEIN-VOLHARD, C., 1977 Genetic analysis of pattern formation in the
embryos of *Drosophila melanogaster*: characterization of the maternal-effect
mutation *bicaudal*, *Wilhelm Roux's Arch. Dev. Biol.*, **183**: 249-268
- NÜSSLEIN-VOLHARD, C., and E. WIESCHAUS, 1980 Mutations affecting segment
number and polarity in *Drosophila*, *Nature*, **287**: 795-801

- PAINTER, T.S., 1933 A new method for the study of chromosome rearrangements and the plotting of chromosome maps, *Science*, **78**: 585-586
- PARO, R. 1990 Imprinting a determined state into the chromatin of *Drosophila*, *Trends Genet.*, **6**: 416-421
- PEIFER, M., F. KARCH and W. BENDER, 1987 The bithorax complex: control of segmental identity, *Genes Dev.*, **1**: 891-898
- PELLING, C., 1959 Chromosomal synthesis of ribonucleic acid as shown by the incorporation of uridine labelled with tritium, *Nature*, **184**: 655-656
- PIROTTA, V., H. STELLER and M.P. BOZETTI, 1985 Multiple upstream regulatory elements control the expression of the *Drosophila white* gene, *EMBO J.*, **4**: 3501-3508
- PIROTTA, V., 1991 The genetics and molecular biology of *zeste* in *Drosophila melanogaster*, *Adv. Genet.*, **29**: 301-348
- RASTELLI, L., C.S. CHAN and V. PIROTTA, 1993 Related chromosome binding sites for *zeste*, suppressors of *zeste* and *Polycomb* group proteins in *Drosophila* and their dependence on *Enhancer of zeste* function, *EMBO J.*, **12**: 1513-1522
- ROBERTS, J.M. and H. WEINTRAUB, 1986 Negative control of DNA replication in SV40-bovine papilloma virus plasmids, *Cell*, **46**: 741-752
- ROSELAND, C.R., 1976 *Ph.D thesis*, University of California, Irvine
- SAARI, B. and M. BIENZ, 1987 The structure of the *Ultrabithorax* promoter of *Drosophila melanogaster*, *EMBO J.*, **6**: 1775-1779
- SABL, J.F. and C.D. LAIRD, 1992 Epigene conversion: a proposal with implications for gene mapping in humans, *Am. J. Hu. Genet.*, **50**: 1171-1177
- SÁNCHEZ-HERRERO, E., I. VERNÓS, R. MARCO and G. MORATA, 1985 Genetic organization of *Drosophila* bithorax complex, *Nature*, **313**: 108-113
- SAURA, A.O. és V. SORSA, 1979 Electron microscope analysis of the banding pattern in the salivary gland chromosomes of *Drosophila melanogaster*, *Hereditas*, **90**: 39-49
- SLATIS, H.M., 1955a Position effect at the brown locus in *Drosophila melanogaster*, *Genetics*, **40**., 5-23

- SLATIS, H.M., 1955b A reconsideration of the brown-dominant position effect, *Genetics*, **40**: 246-251
- STRUHL, G., 1982 Genes Controlling Segmental Specification in the *Drosophila* Thorax, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**: 7380-7384
- TARTOF, K.D. and S. HENIKOFF, 1991 Trans-sensing Effects from *Drosophila* to Humans, *Cell*, **65**: 201-203
- TIONG, S.Y.K., L.M. BONE and J.R.S. WHITTLE, 1985 Recessive lethal mutations within the bithorax complex in *Drosophila*, *Mol. Gen. Genet.*, **200**: 335-342
- TSAI, J.-Y. and L.M. SILVER, 1991 Escape from genomic imprinting at the mouse *T-associated maternal effect (Tme)* locus, *Genetics*, **129**: 1159-1166
- UPHOFF, D.E., 1949 The expression of alleles at the cubitus interruptus locus in hybrids between *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans*, *Genetics*, **34**: 315-327
- WHITE, R.A.H. és M. WILCOX, 1984 Protein Products of the Bithorax Complex in *Drosophila*, *Cell*, **39**: 163-171
- WHITE, R.A.H. és M. WILCOX, 1985 Distribution of Ultrabithorax Proteins in *Drosophila*, *EMBO J.*, **4**: 2035-2043
- WIESCHAUS, E. and J. SZABAD, 1979 The development and function of the female germ line in *Drosophila*: a cell lineage study, *Dev. Biol.*, **68**: 29-46
- WILDERMUTH, H.R., 1970 Determination and transdetermination in cells of the fruitfly, *Sci Prog.*, **58**: 329-358
- WU, C.-t. and M.L. GOLDBERG, 1989 The *Drosophila zeste* gene and transvection, *Trends Genet.*, **5**: 189-194
- WU, C.-t., 1993 Transvection, Nuclear Structure, and Chromatin Proteins, *J. Cell Biol.*, **120**: 587-590
- XING, Y. and J.B. LAWRENCE, 1991 Preservation of specific RNA distribution within the chromatin-depleted nuclear substructure demonstrated by *in situ* hybridization coupled with biochemical fractionation, *J. Cell Biol.*, **112**: 1055-1063
- YOUNG, M.W. and B.H. JUDD, 1978 Nonessential sequences, genes and the polytene chromosome bands of *D. melanogaster*, *Genetics*, **88**: 723-742

-
- ZACHAR, Z., C.H. CHAPMAN and P.M. Bingham, 1985 On the molecular basis of transvection effects and the regulation of transcription, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **50**: 337-346
- ZAVORTNIK, M. and S. SAKONJU, 1989 The morphogenetic and regulatory functions of the *Drosophila Abdominal-B* gene are encoded in overlapping RNAs transcribed from separate promoters, *Genes Dev.*, **3**: 1969-1981
- ZHIMULEV, I.F., 1974 ³H-uridine labelling patterns in *Drosophila melanogaster* salivary chromosome, *Genetica (USSR)*, **10**: 71-79
- ZINK, B. and R. PARO, 1989 *In vivo* binding pattern of a *trans*-regulator of homeotic genes in *Drosophila melanogaster*, *Nature*, **337**: 468-471