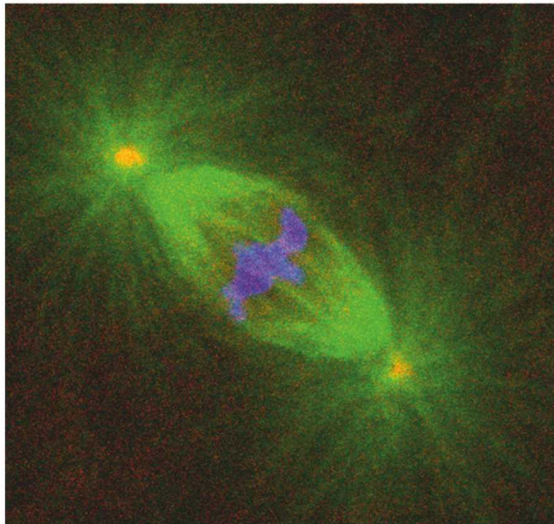


Studia Physiologica  
21/2016



Szabad János

Gének és az egyedfejlődés  
elkezdődése





*Studia Physiologica*  
Fasciculus 21

# **Gének és az egyedfejlődés elkezdődése**

*Szabad János*



A kötet megjelenését a *Studia Physiologica Alapítvány*, a *Semmelweis Egyetem* és a *Semmelweis Kiadó és Multimédia Stúdió Kft.* támogatása tette lehetővé

Sorozatszerkesztő: *Nagy Zoltán*

Nyelvi lektor: *Rusvai Miklós*

Címlapkép: Metafázis egy *Drosophila* embrióban. Az optikai metszeten a DNS kéken, a centroszómák vörösen, a mikrotubulusok zölden tűnnek elő.

© *Szabad János*, 2016

© *Semmelweis Kiadó*, 2016

**ISSN 1219-2791**

**ISBN 978-963-331-401-2**

A könyv szerzői jogi oltalom és kizárólagos kiadói felhasználási jog alatt áll. Bármely részének vagy egészének mindennemű többszörözése kizárólag a sorozatszerkesztő, a szerző és a kiadó előzetes írásbeli engedélye alapján jogszerű.



Felelős kiadó: dr. Táncos László igazgató

Tördelőszerkesztő: Békésy János

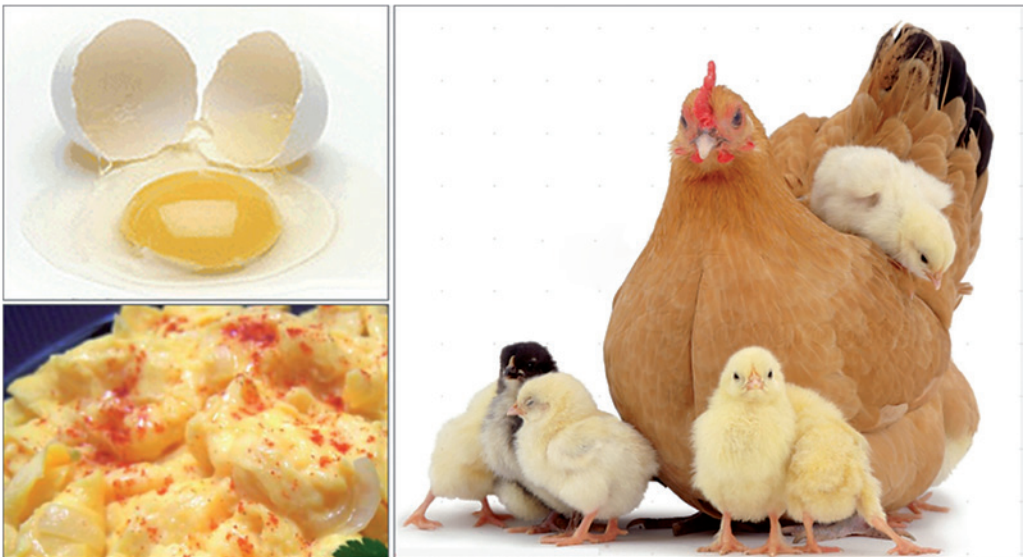
Borítóterv: Táncos László

SKD: 544

Nyomda: Creative Marketing, Győr

## Bevezetés

Hétéves lehettem, amikor felfigyeltem a tojások egyik furcsaságára: legtöbbszörből édesanyám finom rántottát készített, ám a néhány szép nagyot kotló alá tette. Bennük 21 nap alatt történt meg az a csoda, amely megragadta, és máig fogva tartja képzeletem: nemcsak kifejlődött bennük egy-egy pelyhes csibe, hanem minden szervük a helyén volt (1. ábra). A csoda láttán olyan csacskának tűnő kérdésekkel fordultam szüleimhez, mint pl. miért csak egy csőre van egy csibének, és nem kettő. Miért két szeme, és nem egy? Miért éppen ott fejlődik ki a csőre, a szeme, a szárnya, a lába, ahol a helyük van? Talán a tojás sárgájától sárga a csibék pihetolla? És ha igen, mi a helyzet a fekete vagy pláne a tarka csibékkel? A kérdéscsokor az évek során bővült: mi minden van egy tojásban, petében, hogy kerülnek oda, és azok a valamik miként határozzák meg az embriók fejlődését? Alighanem a tojás és a csibék csodája – sok mással egyetemben – volt az a motiváció, amely az élettudományok felé terelte érdeklődésem, életem folyását.



1. ábra. Egy tojás tartalma, és két benne rejlő lehetőség

Az anyai hatás jelenségével – hogy tudni illik az embriogenezis kezdeti lépéseit nem az embrió saját génjei, hanem a tojások (peték, petesejtek) citoplazmájában levő mRNS és fehérjemolekulák határozzák meg – Rolf Nöthiger műhelyében találkoztam (2. ábra). Az anyai hatás témakörében sok izgalmas kérdés fogalmazódott meg. Mi az anyai eredetű tényezők szerepe? Hogyan, és mikor válnak a petesejt citoplazma részévé? Hol vannak a petesejtben? Az anyai eredetű tényezők ismerete segíthetne megérteni azokat a mechanizmusokat, amelyek pl. egy csibe kifejlődéséhez vezetnek.



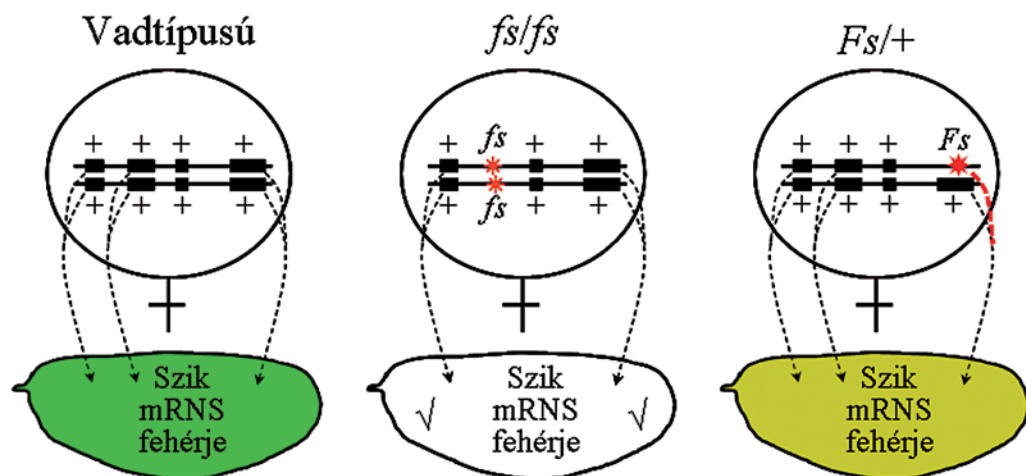
**2. ábra. A Nöthiger műhely Zürichben, 1975-ben.** Háttul: Trudi Schüpbach, Rolf Nöthiger, Sigi Strub, Kurt Dübendorfer, Eric Wieschaus és Szabad János. Elöl: Andreas Dübendorfer, Ursula Nöthiger és Emil Steiner.

Minthogy egy-egy petesejtben, petében ezerszám vannak mRNS- és fehérjeféleségek, azok szerepének egyenkénti megismerése meglehetősen nehéznek, vagy inkább lehetetlennek tűnt. Mivel az anyai hatásért felelős mRNS és fehérjemolekulákat az anya génjei kódolják, a jelenség megismerésére az ún. genetikai boncolás módszere tűnt a legalkalmasabbnak: indukáljunk véletlenszerűen mutációkat, hogy aztán genetikai keresztezések nyomán olyan mutáns élőlényeket készítsünk, amelyekből hiányzik az „eltalált” gén funkciója (3. ábra). A mutáció „eredménye” (fenotípusa) alapján következtethetünk az ép gén funkciójára.

Az 1970-es években csak egyetlen olyan soksejtű faj létezett, amely alkalmas volt a genetikai boncolásra, az anyai hatás tényezőinek azonosítására: a muslica (*Drosophila melanogaster*; Szabad, 2009). [Zárójelben említtem, hogy a muslica, mint modellfaj, az 1900-as évek kezdetétől szolgálja a tudományt. Muslica mutánsok voltak az alapjai hat Nobel-díjas munkájának: Thomas H. Morgan (1936), Herman J. Muller (1946), Edward B. Lewis, Christiane Nüsslein-Volhard és Eric Wieschaus (1995), Jules A. Hoffmann (2011).]

## Az anyai hatású gének azonosítása

Az anyai hatásban szerepet játszó gének azonosításának elvi alapja a következő. Ha mutáció nyomán valamelyik gén elveszti funkcióját, a recesszív mutációra homozigóta nőstények petéiben minden anyai hatású molekulaféleség benne lesz, azt az egyet kivéve, amely nem funkcionál (3. ábra). Várható, hogy a mutációra homozigóta nőstényektől ugyan származnak peték, amelyek meg is termékenyülnek, ám az anyai eredetű mRNS és/vagy fehérje hiányában az embriogenezis elakad, vagy tévútra jut, az embrió elpusztul. A mutáns nőstényeknek – homozigóták lévén egy ún. nőstény-steril (*fs*) mutációra – nem lesznek utódaik (3. ábra). A gondolatmenet megfordítható: ha az anyai hatásban szerepet játszó géneket mutációkkal tervezünk azonosítani, előbb indukáljunk nagyon sok nőstény-steril mutációt. Közülük választhatjuk ki azokat, amelyek a bennünket érdeklő fenotípust mutatják. A fenotípus alapján következtethetünk az ép gén funkciójára. A mutációk lényegében olyan eszközök, amelyek ép géneket azonosítanak. A mutáns allél – az ép gén sérült funkciójú változata – térképezhető: meghatározható, hogy melyik kromoszómának, és melyik pontján van. A térképezés után klónozható az ép gén, megismerhető molekuláris funkciója. Az itt felvázolt gondolatmenet alapján sokan, és sok műhelyben indukáltak és izoláltak muslica *fs* mutációkat. Közülük alighanem Christiiane Nüsslein-Volhard, Eric Wieschaus és Trudi Schüpbach munkái a legjelentősebbek. Az *fs* mutációkból kiindulva vált világossá például, hogy a muslica *bicoid* génje kódolja a fej képződéséhez szükséges fehérjét, vagy a *dorsal* gén azt, amely meghatározza a hasoldali sejtek fejlődési programját.



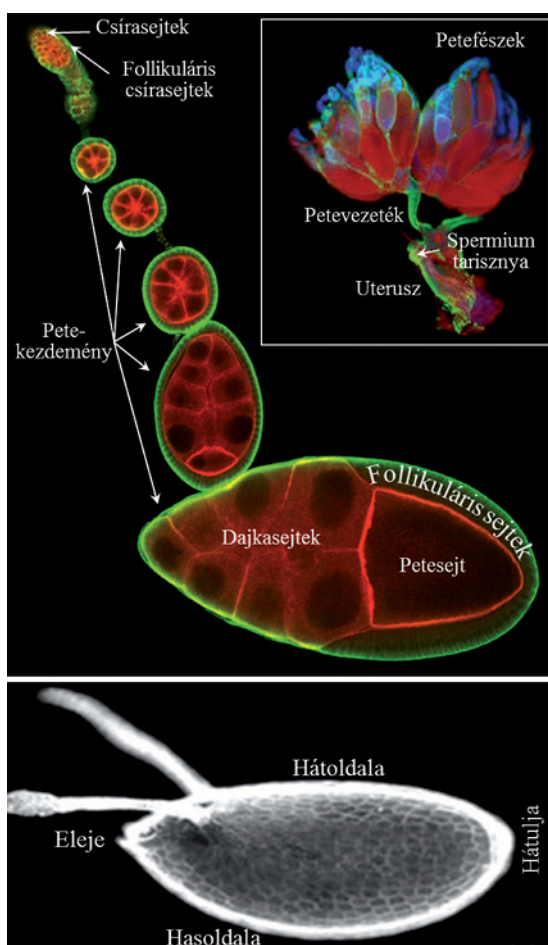
3. ábra. A muslica pete citoplazma tartalma vadtípusú, egy recesszív nőstény-steril (*fs*) mutációra homozigóta, valamint egy domináns nőstény-steril (*Fs*) mutációt hordozó nőstényben. A √ jel azt mutatja, hogy a petesejt citoplazmájából hiányzik az *fs* mutációval azonosított ép gén funkcióképes terméke.

(Bővebb magyarázat a szövegben.)

## Ivarsejt-vonal kimérák, mozaikok

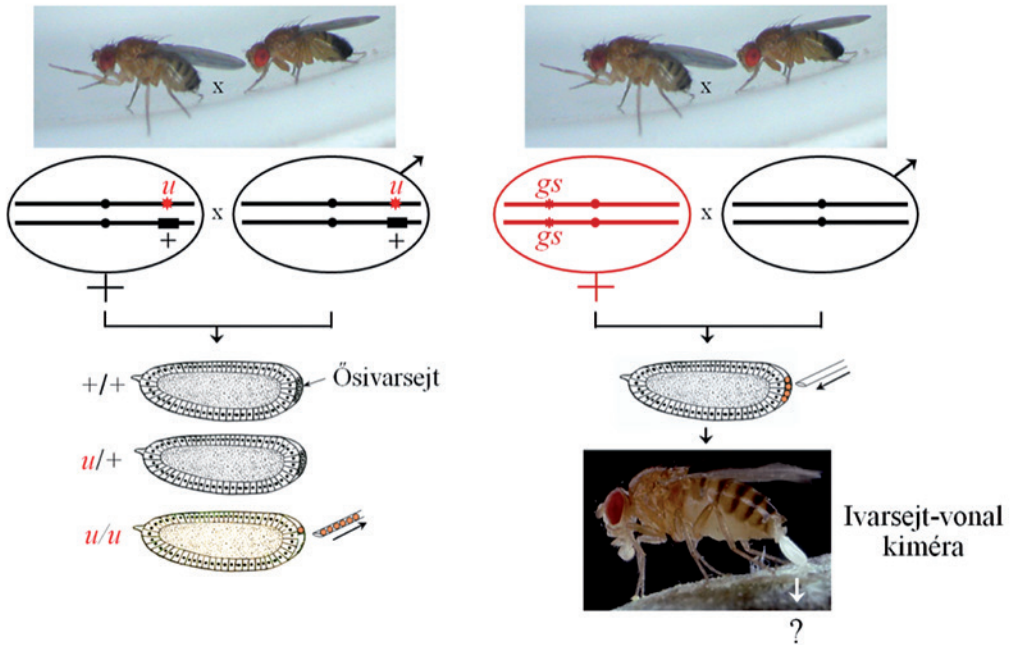
Bőven lehetnek azonban olyan gének is, amelyeknek nem csak a pete(sejt) citoplazma elkészítésében van szerepük, hanem a testi sejtek életében is. Érthető, hogy az ilyen gének funkciójának vesztese letalitáshoz, és nem nőtény-sterilitáshoz vezet. Azt, hogy valamely letális mutációval azonosított ép génnek van-e szerepe az anyai hatásban, ivarsejt-vonal kimérákkal, vagy ivarsejt-vonal mozaikokkal szokás tanulmányozni. Az ivarsejt-vonal kimérák készítése azt jelenti, hogy valamely  $u$  mutációra homozigóta embrió néhány ősvarsejtjét olyan gazdaembrióba ültetjük, melynek testi sejtjei épek. Az ivarsejt-vonal mozaikok esetében  $u/+$  heterozigóta sejtek egyikében-másikjában mitotikus rekombinációt indukálnak, hogy  $u/u$  sejtek képződjenek. Az  $u/u$  sejtek „viselkedése” alapján következtethetünk az  $u$ -val azonosított ép gén szerepére az ivarsejt-vonal sejtek életében.

Mielőtt az ivarsejt-vonal kimérákkal és mozaikokkal megismerkednénk, rövid kitérőként bemutatom, hogy a muslica nőtények mindegyikének két petefészke van, egyenként kb. 17 petecsővel (4. ábra). A petefészkek a petevezetékhez csatlakoznak. A petevezeték az ún. genitális imágókorongból fejlődik ki a bábozódás után, és teremt kapcsolatot a petefészkekkel. A petevezeték az uterusban folytatódik. Az uterusba érkeve a petét a tárolt spermiumok egyike termékenyíti meg. A petecsövek végén 3-4 diploid csírasejt ül, az ősvarsejtek leszármazottai. Osztódásuk nyomán egy-egy olyan sejt képződik, amelyek négy további osztódása nyomán 16 sejt formálódik: a petesejt, valamint az öt tápláló 15 dajkasejt. A 16 sejtet citoplazmaszatórnácskák kötik össze. Egy-egy petekezdemény akkor alakul ki, amikor a 16 sejtet mezodermais eredetű follikuláris sejtek egyetlen rétege burkolja be (4. ábra). A follikuláris sejtek funkciója kettős: egyrészt részt vesznek a petesejt feltöltésében, másrészt elkészítik a petéket burkoló rétegeket.



4. ábra. *Muslica* nőtény petefészkek, egy petecső, benne érésben levő petekezdeményekkel, valamint egy pete képe.



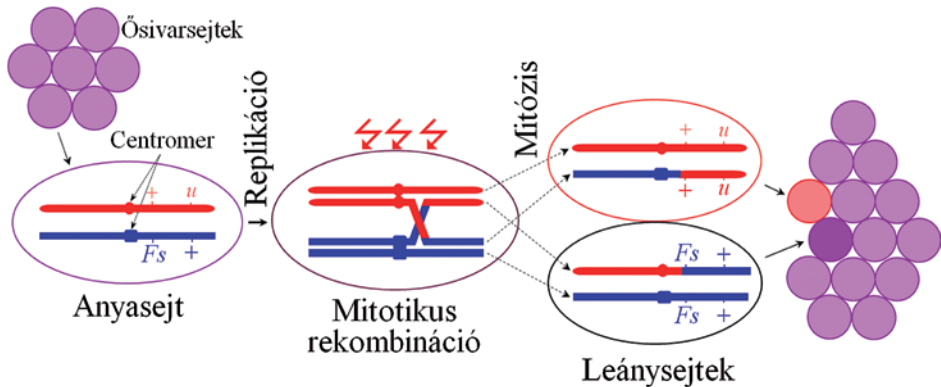


**5. ábra. Séma ivarsejt-vonal kimérák készítésére.** A módszer alapja az ősvarsejték átültetése olyan gazdaembriókba, amelyek testi sejtjei épek. A gazdaembriók gyakorta valamely *grandchildless* (*gs*) mutációra homozigóta nősténytől származnak, akiknek bár nem képződnek saját ősvarsejtjei, kiváló gazdák. Gazdaembrióként szokás vad típusú nőstények, és *Fs(1)K1237/Y* híemek keresztezéséből származó embriókat is használni. Az *Fs(1)K1237/+* gazdaembriók saját petekezdeményei degenerálódnak. Testi sejtjeik viszont tökéletesen funkcionálnak. (Lásd pl. Taubert and Szabad 1987, Galanopoulos et al. 1989, Cumberlandge et al. 1992.)

A csírasejték létét, osztódásuk mechanizmusát, valamint a follikuláris őssejték létezését leíró első dolgozatok munkáink eredményeként születtek (Wieschaus and Szabad 1979, Szabad and Hoffmann 1989).

Ivarsejt-vonal kimérákat<sup>1</sup> ősvarsejték átültetésével szokás készíteni. Az ősvarsejték a muslica embriogenezis harmadik órájában képződnek a muslica embriók hátulsó végében. A mintegy negyven sejt – kb. 12  $\mu\text{m}$  átmérőjű – üvegtűcskével összegyűjthető, és két-három gazdaembrió hátulsó végébe ültethető (5. ábra). A gazdaembriók testi sejtjei épek, funkcióképesek. Az *u/u* donor embriók *u/+* heterozigóta szülőktől származnak (5. ábra). (Minthogy az *u/u* embriók nem ismerhetők fel, csak minden negyedik sejtátültetés az óhajtott típusú. Valójában csak minden nyolcadik, mert a női ősvarsejték a hím gazdaembriókban, illetve a hím ősvarsejték a női gazdaembriókban nem „fogannak meg”. Az *u/+* és a *+/+* donor embriók ún. belső kontrollként töltenek be fontos szerepet; Taubert and Szabad 1987.) Az ép testi környezetbe helyezett *u/u* sejték fejlődnek, kivéve, ha az *u* mutációval azonosított ép gének fontos szerepe van a peték és/vagy

<sup>1</sup> A kimérák olyan élőlények, amelyek testét alkotó sejtek különféle forrásokból erednek. Többnyire embriók fúziója, vagy sejtek átültetése nyomán képződnek.



**6. ábra. Mitotikus rekombináció és a domináns nőstény-steril technika lényege.** Egy *u* és egy domináns nőstény-steril (*Fs*) mutációra transz-heterozigóta ősvarsejtből mitotikus rekombináció nyomán egy olyan *u/u* leánysejt képződik, amely megszabadult az *Fs* terhétől, és petévé fejlődhet. (Mitotikus rekombinációt általában 1000 Rad röntgensugárással indukálnak.) Az ideális *Fs* mutáció megakadályozza a peték képződését. Itt *u* többnyire egy zigotikus letális, vagy egy nőstény-steril mutáció jele. Amint fentebb említettük, ha az *u* mutációval azonosított ép génnek nincs szerepe az ősvarsejtek életében, az *u/u* sejtéből ép pete, amiből utód fejlődik. Ha az ép génnek van szerepe a pete, vagy az embrióképződésben, az *u/u* sejtéből nem, vagy rendellenes pete és/vagy embrió képződik.

az embriók fejlődésében. Ilyen esetekben a kiméra petekezdeményekből – amelyekben az *u/u* pete- és dajkasejteket ép follikuláris sejtek burkolják, és a petekezdemény ép testi sejtek környezetében fejlődik – vagy nem képződnek peték, vagy ugyan képződnek peték, ám abnormálisan zajlik az embriogenezis. Ha viszont az *u* mutációval azonosított ép génnek nincs szerepe sem a peték, sem az embriók képződésében, a kiméra petekezdeményekből ép peték és utódok származnak.

Ivarsejt-vonal mozaikokat<sup>2</sup> mitotikus rekombinációval is szokás generálni. Mitotikus rekombináció nyomán az *u/+* heterozigóta sejtek egyik leánysejtje *u/u* homozigótává válik, miközben a többi ősvar- és follikuláris sejt is ép, funkcióképes marad (6. ábra). Lényegében az ivarsejt-vonal kimérakéhoz hasonló helyzet áll elő. Ám csak hasonló. Ha ugyanis az *u* mutációval azonosított ép gén (+) a mitotikus rekombináció időpontja előtt aktív, úgy terméke benne lehet az *u/u* sejt citoplazmájában, és betöltheti funkcióját. Egészen addig, amíg le nem bomlik, és/vagy ki nem hígul. (A jelenséget, hogy ti. az ép gén terméke segíti az *u/u* sejtek életét, perduranciának nevezik; Garcia-Bellido and Merriam 1971a.)

Vajon miként lehet különbséget tenni az *u/u* és az *u/+* sejtek között? Az ún. domináns nőstény-steril technika elegáns megoldást kínál: ha az *u/+* sejtek hordoznak egy olyan *Fs*, domináns nőstény-steril mutációt, amely megakadályozza peték képződését, csak az *u/u* sejtéből képződhetnek peték (6. ábra). Kivéve, ha az *u* mutációval azonosított gén funkciója létfontosságú a peték és/vagy az embriók képződésében.

<sup>2</sup> A mozaikok az olyan élőlények, amelyek testét alkotó sejtek mindegyike a zigótából származik, ám a sejtek geno- és/vagy fenotípusa különbözik.

## Domináns nőtény-steril mutációk

Az első, ún. domináns nőtény-steril (*Fs*) mutációról, *Fs(2)D*-ről Yager és King adott hírt 1971-ben. Az *Fs(2)D* felhasználásával dolgozta ki Eric Wieschhaus az ún. domináns nőtény-steril technikát, amely lényegét a 6. ábra mutatja (Wieschhaus 1980). A technika bevált, alkalmazásával nagyszerű eredmények születtek. Ám minthogy *Fs(2)D* a második kromoszóma jobb karján van, csak az ezen a karon levő mutációkat lehetett a technikával tanulmányozni, a muslica génjeinek csak mintegy ötödét. Kimaradtak azok, amelyek a második kromoszóma bal karjához, az első (= X), illetve a harmadik kromoszómához kapcsoltnan öröklődnek. Kézenfekvő volt a feladat: indukáljunk olyan *Fs* mutációkat, amelyekkel a domináns nőtény-steril technika kiterjeszthető a még le nem fedett kromoszómákra, a harmadik és az X kromoszómára. Az itt felvázolt megfontolás alapján indukálta és izolálta Katia Komitopoulou *Fs(1)K1237*-et, amely az X kromoszómához kapcsoltnan öröklődik (Komitopoulou et al. 1983). (*Fs(1)K1237* ma *ovo<sup>D1</sup>* néven ismert.) Az *Fs(1)K1237/+* nőtényektől nem származnak peték. Azért nem, mert *Fs(1)K1237* tönkreteszi az ősvarsejtek funkcióját (Taubert and Szabad 1987). Mindeközben a testi sejtek funkciója érintetlen marad. *Fs(1)K1237* módfelett sikeresnek bizonyult: hasznát számszámra említik tudományos dolgozatok. Mi olyan *Fs* mutációk indukálására adtuk fejünket, amelyek a második, illetve a harmadik kromoszómákhoz kapcsoltnan öröklődnek. Voltak azonban más motivációk is!

Bár az 1980-as évek közepén funkcióvesztéses típusú, recesszív *fs* mutációkkal sok anyai hatású gént azonosítottak, csak bő két tucatnyi molekuláris funkcióját ismerték meg. A módszer ugyanis meglehetősen munkaigényes, költséges és hosszadalmas. Mi azt gondoltuk, hogy egyszerűbb lehet, ha nem funkcióvesztéses, recesszív, hanem funkcionyeréses típusú, *Fs* mutációkkal azonosítunk géneket (3. ábra). Köztük olyanokat is, amelyeknek az embriogenezis elkezdődésében van szerepük. Azt is elképzelhetőnek tartottuk, hogy az *Fs* mutációkkal azonosított gének között olyanok is lehetnek, amelyek funkcióvesztéses alléljai homozigóta formában életképtelenek. Az *Fs* mutációkból kiindulva reméltük megtudni, hogy mi az a jel, amely az embriogenezis elkezdődéséhez szükséges, hogy miként „veszi észre” egy pete(sejt), hogy megtermékenyült, és elkezdődhet egy új élet kialakulása?

A domináns mutációknak több típusa van (1. táblázat). A funkcionyeréses típusúak olyan fehérjék képződését kódolják, amelyeknek ugyan van funkciójuk, ám azok eltérnek az ép, ún. vad típusú fehérjékétől. A funkcionyeréses mutáció domináns negatív típusú, amennyiben az ép és a mutáns allél terméke ugyanabban a folyamatban vesz részt. Úgy, hogy a mutáns fehérje akadályozza az ép funkcióját (1. táblázat). Minthogy a domináns negatív *Fs* mutációk esetében a mutáns allél terméke megakadályozza az ép funkcióját várható, hogy a funkcionyeréses és a funkcióvesztéses mutáns fenotípus ugyanolyan, vagy meglehetősen hasonló (3. ábra). Az egyébként ritka neomorfa típusú mutációk terméke olyan folyamatba „kotnyeleskedik bele”, amelyben a gén ép változatának semmilyen szerepe sincs.

Az *Fs* mutációk indukálását és izolálását tehát két gondolat motiválta: készüljenek új eszközök a domináns nőstény-steril technika kiterjesztéséhez, és azonosítsunk olyan géneket, amelyek funkciója az embriogenezis elkezdődéséhez szükséges.

**1. táblázat. A mutációk típusai és néhány jellemzőjük**

Jellege	Típusa		Fenotípus egy további ép (+) allél jelenlétében
Recesszív	Funkcióvesztéses ( <i>u/u</i> )	–	Éppé válik <i>u/u</i> +
Domináns	Dózisérzékeny	Haplo-elégtelen <i>u</i> +/+, vagy –/+	Éppé válik <i>u</i> +/++ vagy –/+/+
		Triplo-abnormális +/+/+	Súlyosbodik +/+/++
	Funkciónyeréses	Domináns negatív <i>D</i> +/+	Csökken súlyossága <i>D</i> +/+
		Neomorf <i>N</i> +/+	Változatlan marad <i>N</i> +/+

+ az ép gén, *u* egy funkcióvesztéses mutáns allél, „–” pedig egy olyan deficiencia jele, amely eltávolítja a gént.

Az *Fs* mutációk indukálásába és izolálásába 1984-ben kezdtünk az MTA Szegedi Biológiai Központjában (SZBK), a Genetikai Intézetben Erdélyi Miklóssal, aki akkoriban még egyetemi hallgató volt (7. ábra). Kutatótársaink körében általános volt a vélekedés, hogy az *Fs* mutációk módfelett ritkák, és *Fs(2)D* alighanem különös kivétel. És ha mégis sikerülne izolálnunk *Fs* mutációkat, hogyan bontanánk ki a bennük rejlő lehetőségeket? Miként térképeznénk be őket? Közismert ugyanis, hogy crossing over – a genetikai térképezés alapja – muslicában csak a nőstényekben történik, a hímekben nem. Vagyis: minthogy

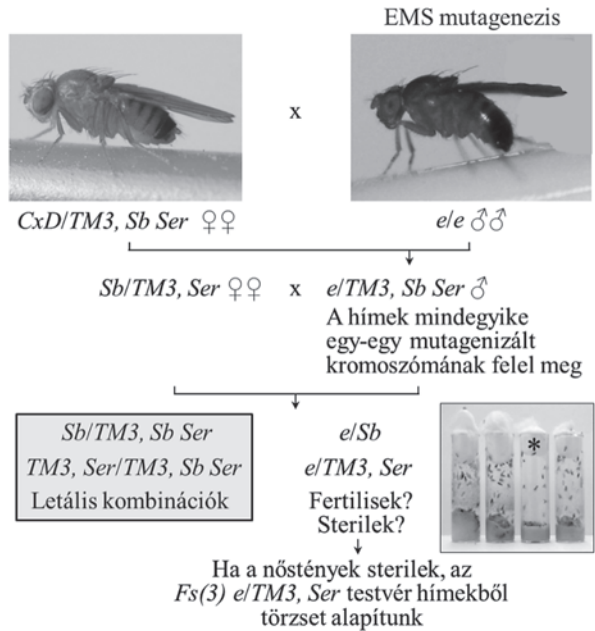


**7. ábra. Csoportunk 1991-ben, az SZBK előkertjében.** Hátul, balról jobbra: Jósvay Kati, Erdélyi Miklós, Lehoczki Klára. Elöl: Szabad János, Mihály József és Máthé Endre.

az *Fs*/+ nőtények sterilek, az *Fs* mutációk a megszokott módon nem térképezhetők. Miként állapítanánk meg, hogy az *Fs* mutációk mely géneket azonosítják, és miként ismernék meg az ép gének molekuláris funkcióját? A sok kérdőjel ellenére mi mégis azt gondoltuk, hogy az ötlet megér egy kísérletet, és belevágtunk az *Fs* mutációk indukálásába, izolálásába.

A sémát, amely alapján dolgoztunk, és a harmadik kromoszómához kapcsolatosan öröklődő *Fs(3)* mutációkat indukáltuk, izoláltuk, a 8. ábra szemlélteti. Egy olyan harmadik kromoszómát választottunk, amely az *e* (*ebony*, sötét testszín) marker-mutációval volt megjelölve, és nem hordozott letális mutációt. (A marker-mutáció lehetővé teszi a megjelölt kromoszóma nyomon követését az egymást követő generációk folyamában.) Ezután *e/e* hímeket kezeltünk EMS-sel (etil-metánszulfonáttal), a kémiai mutagének egyikével. Annak reményében, hogy kromoszómaik egyikében-másikában véletlenszerűen indukálódnak *Fs* mutációk. A hímeket *CxD/TM3, Sb Ser* nőstényekkel kereszteztük. (*CxD* és *TM3, Sb Ser* olyan, ún. balanszer kromoszómák jelei, amelyek lényegében kiküszöbölik a rekombináns kromoszómák képződését, balanszírozzák a kromoszómákat. A balanszer kromoszómák, hogy hordozóik felismerhetőek legyenek, olyan domináns marker-mutáció(ka)t is hordoznak, mint pl. a *D*, a *Sb* vagy a *Ser*. A *Drosophila* mutációkról a <http://flybase.org/> honlapon tudhat meg bővebbet az érdeklődő.) Az utód *e/TM3, Sb Ser* hímek mindegyike egy-egy mutagenizált kromoszómát reprezentál. Az *e/TM3, Sb Ser* hímeket egyenként *Sb/TM3, Ser* nőstényekkel kereszteztük. A muslica bő százéves genetikájának hozadékaként volt elérhető, hogy csak az *e/Sb* és az *e/TM3, Ser* utódok maradtak életben, lehetett megvizsgálni, hogy fertilisek, vagy sterilek. Amennyiben a nőstények sterilek voltak, és az *e*-jelölt kromoszómájuk *Fs(3)* mutációt hordozott, a testvér *Fs(3) e/TM3, Ser* hímekből törzset alapítottunk (8. ábra).

A törzs lényegében olyan egymást követő keresztezések sorozata, amelyekből származó utódok közül csak azok fertilisek, amelyek genotípusa szüleikével azonos. A törzsekben a mutációk kényelmesen, elvileg bármeddig fenntarthatók. Az *Fs(3)* mutációkat fenntartó törzsek lényegét a 2. táblázat mutatja be.



**8. ábra.** Séma a harmadik kromoszómához kapcsolatosan öröklődő *Drosophila* domináns nőstény-steril – *Fs(3)* – mutációk izolálására. Amíg a \*-gal jelölt fiolában levő, *Fs(3)* mutációt hordozó nőstényektől nem származtak utódok, a másik háromban lárvák és bábok is voltak. (Részletes magyarázat a szövegben.)

Itt mondjuk el, hogy egy muslica nőtény nagyjából 2,5 mm hosszú, a tömege kb. 1,5 mg. A hímek némileg rövidebbek, és mintegy 1 mg-osak. Egy pete 0,5 mm hosszú, tömege 10 µg. Az embriogenezis egy, a lárvállapot 4, és a bábállapot is 4 napig tart. Egy muslica kb. egy hónapig él. Ezalatt egy nőtény akár ezer petét is rakhat. Itt fel nem sorolt további kiváló tulajdonságai tették a muslicát az egyik legjobban bevált modellfajjává (Szabad 2009).

**2. táblázat. A *T(1;3)OR60/TM3, Sb Ser* nőtények és az *Fs(3) e/TM3, Sb Ser* hímek keresztezéséből származó utódok típusai, jellemzői**

Utódok	Nemük	Tulajdonságuk
<i>Fs(3) e/TM3, Sb Ser</i>	Nőtények	Sterilek
	Hímek	Fertilisek → törzsfenntartás
<i>Fs(3) e/T(1;3)OR60</i>	Nőtények	Sterilek
	Hímek	Letális kombináció
<i>T(1;3)OR60/TM3, Sb Ser</i>	Nőtények	Fertilisek → törzsfenntartás
	Hímek	Letális kombináció
<i>TM3, Sb Ser/TM3, Sb Ser</i>	Nőtények	Letális kombináció
	Hímek	Letális kombináció

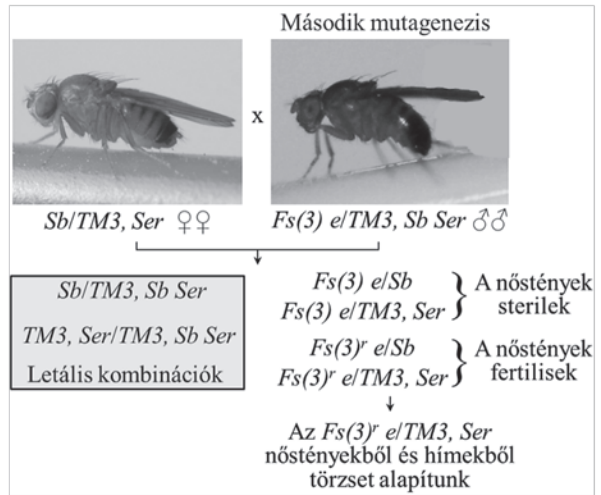
Megjegyzés: a *T(1;3)OR60* olyan kromoszómaátrendeződést jelöl, amely csak a nőtényekben életképes, a hímekben nem.

Nagy örömünkre, már az első mutagenézis kísérlet sikerrel járt: néhány ezer EMS-mutagenizált kromoszóma közül négy hordozott *Fs(3)* mutációt. A kezdeti sikeren felbuzdulva további EMS-mutagenézisek következtek, és végeredményben 51 *Fs(3)* mutációt izoláltunk, nagyjából ötvenezer mutagenizált kromoszómából (Erdélyi and Szabad 1989). Az 1/1000 arány egészen jó, különösen, ha figyelembe vesszük, hogy a kísérlet nem költséges, időigénye nem túl nagy, és könnyű kiszűrni a *Fs(3)* mutációt hordozó vonalakat (8. ábra). Egy mellékkísérletben arra is fényt derítettünk, hogy az *Fs(3)* mutációk valóban ritkák: kb. 2500 indukált letális mutációra egy *Fs(3)* jut (Erdélyi és Szabad 1989). A 8. ábrán bemutatotthoz meglehetősen hasonló séma alapján 24, a második kromoszómához kapcsoltan öröklődő *Fs(2)* mutációt is izoláltunk (Szabad et al. 1989).

## Funkciónyerésből funkcióvesztés

Ha helyes volt feltételezésünk, és a 75 *Fs* mutáció valóban funkciónyeréses típusú, úgy az *Fs* mutációk második mutagenézis során funkcióvesztéses, recesszív, ún. revertáns allélokká alakíthatók. E megfontolás alapján valamennyi *Fs* mutációt második mutagenézisnek vetettük alá: EMS-sel, röntgensugárzással és/vagy P-elemmel, a Dro-

sophila egyik transzpozonjával „bombáztuk” őket. Az *Fs(3)* mutációk esetében a 9. ábrán bemutatott sémát alkalmaztuk. A másodszer mutagenizált *Fs(3) e/TM3, Sb Ser* hímeket *Sb/TM3, Ser* nőstényekkel kereszteztük. Amint fentebb láttuk, csak az *Fs(3)*-at hordozó utódok élnek túl, amely nőstények pedig sterilek. Ám ha az *Fs(3)* allélból a második mutagenézis nyomán *Fs(3)<sup>r</sup>*, funkcióvesztéses típusú, recesszív allél képződött, az *Fs(3)<sup>r</sup>/Sb* és az *Fs(3)<sup>r</sup>/TM3, Ser* nőstények fertilisek, lesznek utódaik. Vagyis az *Fs(3)<sup>r</sup>* allélok könnyen, kényelmesen izolálhatók, és törzsekben fenntarthatók (9. ábra). (Az *Fs(2)<sup>r</sup>* allélok indukálására és izolálására kidolgozott séma a Szabad et al. 1989-es dolgozatban lelhető fel.)



9. ábra. Séma revertáns, *Fs(3)<sup>r</sup>* allélok izolálására.

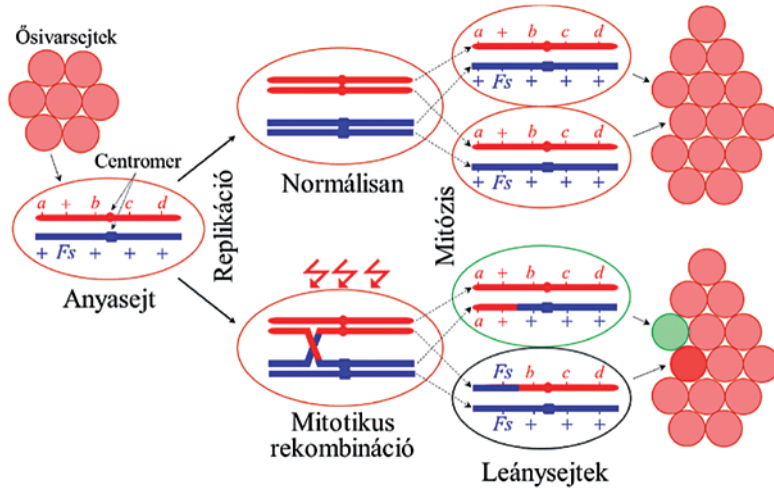
(Magyarázat a szövegben.)

hatók, és törzsekben fenntarthatók (9. ábra). (Az *Fs(2)<sup>r</sup>* allélok indukálására és izolálására kidolgozott séma a Szabad et al. 1989-es dolgozatban lelhető fel.)

A második mutagenézis során a 75 *Fs* mutáció közül 72-nek képződtek revertáns alléljai. Többnyire néhány száz, esetleg néhány ezer másodszer is mutagenizált, *Fs*-t hordozó kromoszóma közül egy hordozott revertáns allélt (Erdélyi and Szabad 1989, Szabad et al. 1989). Az *Fs<sup>r</sup>* allélok módfelett értékesek. Komplementációs analízisük során megállapíthatjuk, hogy mely *Fs<sup>r</sup>* allélok azonosítják ugyanazt az ép gént, vagy esetleg valamely már ismert gént. A *Fs<sup>r</sup>* allélokból kiindulva klónozható az *Fs* mutációval azonosított ép gén, és megismerhető molekuláris funkciója. Az a három *Fs* mutáció alighanem haplo-elégtelen típusú, amelyeknek nem képződtek revertáns alléljai. Ígéretes volt, hogy a legtöbb *Fs* mutáció funkciónyeréses típusú. Reményeink szerint domináns negatívak.

## Az *Fs* mutációk térképezése

Az *Fs* mutációkat röntgensugársással indukált mitotikus rekombináció alapján térképeztük. Genetikai keresztezések során olyan nőstényeket készítettünk, amelyek egyik kromoszómája az *Fs* mutációk egyikét, a másik pedig recesszív marker-mutációkat hordozott (10. ábra). A diploid ősvarsejtek osztódása során csupa *Fs/+* ősvarsejt képződik, amelyek egyikéből sem származik utód. A röntgensugárzás kromoszóma töréseket indukál, amelyek egyike-másika nyomán mitotikus rekombináció következik be. (Rekombináció, mert az esemény során olyan ún. rekombináns kromoszómák képződnek, amelyeknek anyai és apai eredetű szakaszai is vannak, mitotikus, mert az esemény a mitózis révén válik nyilvánvalóvá.) A mitotikus rekombináció eredményeként olyan



**10. ábra. Séma *Fs* mutációk térképezésére.** Itt *a*, *b*, *c* és *d* recesszív marker-mutációk, + a vad típusú allélok jele. Amennyiben az *Fs* mutáció az ősvarsejtek funkcióját érinti, csak a zölden jelölt sejtből származhatnak utódok. Ha a nőstényeket *a b c d/a b c d* hímeikkel keresztezzük, az utódokban – miközben a *b*, és a *b*<sup>+</sup>, a *c* és a *c*<sup>+</sup>, valamint a *d* és a *d*<sup>+</sup> allélok allélok egyforma gyakorisággal vannak jelen – csak az *a* allél fordul elő, jelezve, hogy az *Fs* mutáció az *a* és a *b* marker-mutációk közötti szakaszban van. (Részletes magyarázat a szövegben.)

leánysejt is képződhet, amely megszabadult az *Fs* mutációtól, és belőle immáron utód származhat. (Feltéve, hogy az *Fs* mutáció az ősvarsejtek funkcióját akadályozza.) Az *Fs*-mentes sejt homozigóta arra a marker-mutációra, amely a mitotikus rekombináció helye és a kromoszóma kar vége között van (a 10. ábrán *a*-ra). Amennyiben a nőstényeket olyan hímeikkel keresztezzük, amelyek homozigóták a recesszív marker-mutációk mindegyikére, az utódokban a marker-mutációk mutáns és vad típusú (+) alléljai is felbukkannak, fele-fele arányban. Kivéve az(oka)t a marker-mutáció(ka)t, amely(ek) az *Fs*-től „kintebb” van(nak), amely(ek)nek csak a mutáns allélja lelhető fel az utódokban. Az itt bemutatott módszer alapján meghatározható, hogy a *Fs* mutáció mely két marker-mutáció közötti szakaszban van (Erdélyi és Szabad 1979, Szabad et al. 1979).

Bár az itt bemutatott módszer bevált, érték bennünket meglepetések. (1) Egy korábbi munkánkban kifejtett muslica nőstényekben indukálunk mitotikus rekombinációt, jelöltünk meg marker-mutációkkal sejteket (Wieschaus and Szabad 1979). A genetikailag megjelölt sejtekből fejlődő első petéket kb. tíz nap elteltével rakják le a muslica nőstények: a petéképződés mintegy tíz napot vesz igénybe. Nos, legalább 15, olykor 21 napot is kellett arra várnunk, hogy az *Fs*/+ nőstények lerakják azokat a petéket, amelyek mitotikus rekombináció nyomán képződtek, és *Fs*-mentessé váltak (10. ábra). Vajon mi a késedelem oka? A magyarázat kézenfekvő: a mitotikus rekombináció indukációjakor az *Fs* mutáns allél terméke már benne van az ősvarsejtek citoplazmájában, és funkcionál az *Fs*-mentes sejtekében is. Addig akadályozza az *Fs*-mentes sejtek életét, ameddig le nem bomlik, és/vagy ki nem hígul. A jelenség minden bizonnyal azt mutatja, hogy az *Fs*-azonosított ép gén funkcionál az ősvarsejtekben, és szerepe módfelett valószínű



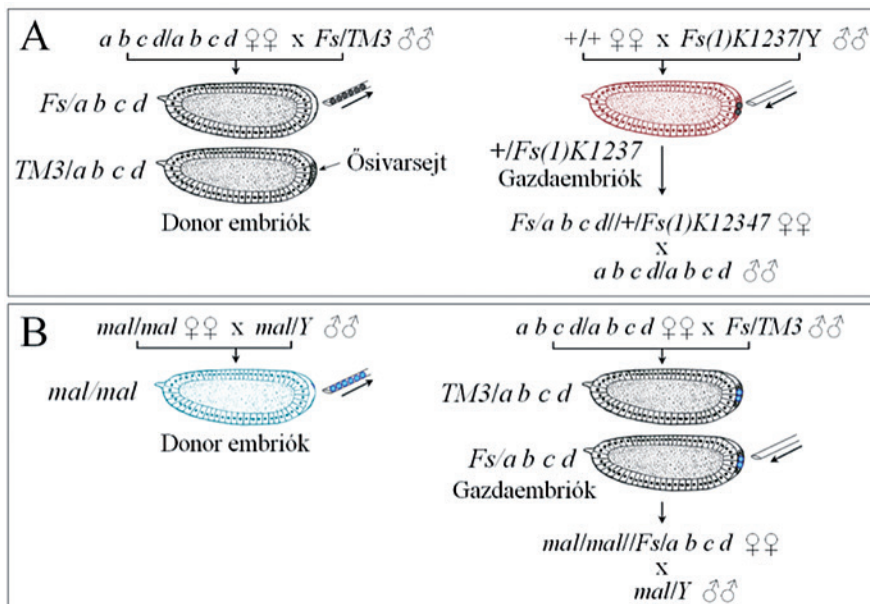
az anyai hatásban. (2) A 75 között volt négy olyan *Fs* mutáció is, amelyek esetében mitotikus rekombináció nyomán képződtek utódok, akikben azonban minden marker-mutáció mutáns és vad típusú (+) alléja egyaránt jelen volt, és ráadásul azonos gyakorisággal (Erdélyi és Szabad 1989, Szabad et al. 1989). A legvalószínűbb magyarázat az, hogy az *Fs* mutáció nem az ősvivar-, hanem például a folliculáris sejtek funkcióját befolyásolja, vagyis az *Fs*-azonosított ép génnek nem az ősvivar-, hanem a testi sejtek valamelyik típusában van szerepe.

Az *Fs* mutációk úgy is térképezhetők, hogy – amint azt Christiane Nüsslein-Volhard laboratóriumában kidolgozták (Anderson et al. 1985) – diploid spermatogoniális sejtekben indukálnak mitotikus rekombinációt, a 10. ábrán bemutatott séma szerint. A besugárzott hímeket olyan nőtényekkel keresztezik, amelyek homozigóták a recesszív marker-mutációkra. Az utódok közül kiválogatják a rekombináns nőtényeket, és megvizsgálják: sterilek, vagy sem. Ha egynapos bábokat sugarazunk be mitotikus rekombináció indukációjára, és a kifejlődő hímek utódait vizsgáljuk, közöttük kb. minden századik rekombináns (Erdélyi and Szabad 1989).

## Kimérák, kimérák

A kérdést, hogy ti. a térképezés során különösen viselkedő *Fs* mutációk valóban nem az ősvivar-, hanem valamely testi sejt típus funkcióját akadályozzák, ivarsejt-vonal, valamint petefészkek kimérák tanulmányozásával döntöttük el. Ivarsejt-vonal kimérákat ősvivar-sejtek átültetésével készítettünk (11. ábra). Először *Fs/a b c d* embriók ősvivar-sejtjeit ültettük *+Fs(1)K1237* gazdaembriókba. (Itt *a, b, c,* és *d* recesszív marker-mutációkat jelöl. A *+Fs(1)K1237* muslica nőtények ivarsejt-vonal sejtjei – amint fentebb említettük – degenerálódnak, testi sejtjeik viszont épek, funkcióképesek.) A kifejlődő *Fs/a b c d/+Fs(1)K1237* ivarsejt-vonal kimérákat *a b c d/a b c d* hímekekkel kereszteztük. Amennyiben az *Fs* mutáció az ivarsejt-vonal sejtek funkcióját akadályozza, a kimérák az *Fs* mutáció jellegzetességét mutatják. Ha viszont az *Fs* mutáció nem az ivarsejt-vonalat, hanem a testi sejtek valamely típusának funkcióját teszi tönkre, a kiméráknak lesznek utódaik. Sőt, az *Fs/a b c d* ivarsejt-vonal sejtekből rekombináns utódok is származnak. Ha a kimérák partnerei *a b c d/a b c d* hímek, a kimérák rekombináns nőtény utódait megvizsgálva térképezhető az *Fs* mutáció. (Nemcsak két marker-mutáció közé, hanem – itt nem részletezett ok miatt – meglehetősen pontosan; Erdélyi and Szabad 1979.)

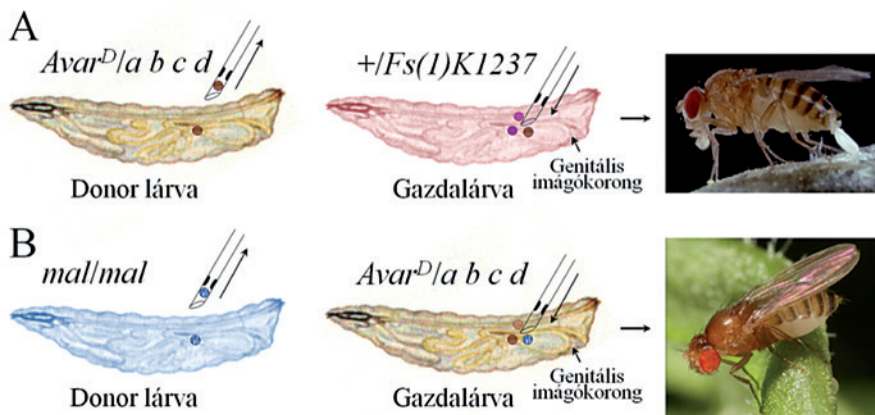
A fordított irányú sejtátültetéssel – amit a 11. ábra B része mutat – úgy készítettünk ivarsejt-vonal kimérákat, hogy ép ősvivar-sejteket ültetünk *Fs/a b c d* embriókba. (Valójában az ép ősvivar-sejtek homozigóták voltak a *mal* marker-mutációra, ami okán felismerhetők a petekezdemények, és az utódok is. A *TM3/a b c d* gazdaembriók belső kontrollok voltak.) Ha az *Fs* mutáció az ivarsejt-vonal sejteket teszi tönkre, és a testi sejteket épen hagyja, úgy a *mal/mal//Fs/a b c d* kiméráktól származnak utódok. Ha ellenben az *Fs* mutáció a testi sejtek valamelyik típusának életét akadályozza, a kiméráknak nem lesznek utódaik.



**11. ábra. Ivarsejt-vonal kimérák készítése ősvarsejteket átültetésével.** A: *Fs*-hordozó ősvarsejteket ültettünk ép testi sejtek környezetébe. (Az *Fs(1)K1237* mutáció az ivarsejt-vonal sejtek degenerációját okozza, a testi sejtek funkcióját nem befolyásolja. A *TM3/abc d* embriók belső kontrollként szolgálták a kísérletek sikerét.) Ha az *Fs* mutáció a testi sejtek funkcióját befolyásolja, az *Fs/abc d//+/Fs(1)K1237* kiméráktól gyűjtött rekombináns kromoszómák alapján térképezhető az *Fs* mutáció. B: ép (valójában a *mal* recesszív marker-mutációval genetikailag megjelölt) ősvarsejteket ültettünk *Fs/abc d* környezetbe. A kimérák tulajdonságai alapján eldönthető, hogy az *Fs* mutáció az ivarsejtvonal, vagy a testi sejtek funkcióját befolyásolja. (Részletes magyarázat a szövegben.)

A fent bemutatott típusú kimérák vizsgálata megmutatta, hogy a 75 *Fs* mutáció között négy úgy okoz domináns nőstény-sterilitást, hogy a testi sejtek funkcióját zavarja: *Apc<sup>D</sup>*, *Avar<sup>D</sup>*, *Etre<sup>D</sup>* és *Ugra<sup>D</sup>* (Erdélyi and Szabad 1989, Szabad et al. 1989). Közülük különösen *Avar<sup>D</sup>* bizonyult érdekesnek. Az *Avar<sup>D</sup>/abc d//+/Fs(1)K1237* ivarsejt-vonal kimérák mindegyikétől sok-sok utód származott. (Köztük rekombinánsok is, amelyek alapján *Avar<sup>D</sup>* helyét megállapíthattuk; Erdélyi and Szabad 1989.) Ellenben a *mal/mal//Avar<sup>D</sup>/abc d* kimérákban bár fejlődtek kiméra petekezdemények (amelyekben a *mal/mal* pete- és dajkasejteket *Avar<sup>D</sup>/abc d* follikuláris sejtek burkolták), és peték is, ám azokat a kiméra nőstények nem rakták le. (A kimérák éppen úgy „viselkedtek”, ahogy az *Fs(3)Avar<sup>D</sup>/+* nőstények: nem rakták le százsámra képződött érett petéiket.) Vagyis *Avar<sup>D</sup>* nem a follikuláris, hanem valamely más testi sejtípus funkcióját befolyásolja. Melyikét?

A kérdést megválaszolandó petefészkek kimérákat készítettünk (12. ábra; lásd pl. Cumberledge et al. 1992). Az első kísérletben egy-egy *Avar<sup>D</sup>/abc d* lárvális petefészket ültettünk *+/Fs(1)K1237* lárvákba. A beültetett petefészkekből peték és utódok is származtak. (Minthogy a kimérákat *abc d/abc d* hímekkel kereszteztük, megvizsgálhattuk, hogy a rekombináns utódok sterilek, vagy sem, *Avar*-t térképezhattuk.) A kísérletből kiderült, hogy *Avar<sup>D</sup>*-nek nincs szerepe a petefészkek életében. Amikor egy-egy ép (*mal/mal*, genetikailag megjelölt) lárvális petefészket ültettünk *Avar<sup>D</sup>/abc d* gazdalárvákba,



**12. ábra. Petefészek kimerák készítése lárvális petefészek átültetésével.** A kapcsolat a petefészek és a petevezeték között a bábozódás után alakul ki, miközben a petevezeték a genitális imágókorongból kifejlődik. A megfelelő helyre ültetett lárvális petefészek kapcsolódik a petevezetékkel, miután a benne képződő petékből utódok származhatnak. (Részletes magyarázat a szövegben.)

a kifejlődő kimerák egyetlen petét sem tojtak. Annak ellenére, hogy bennük a *mal/mal* petefészek a petevezetékhez kapcsolódtak, és bennük sok tucat pete érett meg. (A kimerák egyik saját petefészke a petevezetékhez kapcsolódott, a másik szabadon volt a potrohban. Mindkettő tele érett petékkal.) Nyilvánvaló, hogy *Avar<sup>D</sup>* megakadályozza a peték lerakását. Eleddig nem közölt eredményeink azt mutatják, hogy azért nem, mert a petevezeték megcsavarodik, elzárul. Azért csavarodik meg, mert az *Avar<sup>D</sup>/+* nőtények kissé hímmé transzformáltak. (A muslica hímek genitális imágókorongja a bábozódás után 180 fokot fordul, hogy a belőle képződő struktúrák a helyükre kerüljenek.) A kismértékű nőtény → hím transzformáció oka az, hogy *Avar<sup>D</sup>* jelenlétében a doublesex-pre-mRNS érése részleges, és tökéletlen is (Timinszky Gyula személyes közlése). Tudvalevő, hogy muslicában a doublesex-pre-mRNS érése a nemi differenciáció fontos lépése (Pomiankowski et al. 2004, Salz 2011, Ruiz et al. 2015).

## **Fs mutációk: eszközök a domináns nőtény-steril technikához**

Az *Fs* mutációk indukálásának, izolálásának egyik célja az volt, hogy legyenek olyan továbbiak, amelyekkel a domináns nőtény-steril technika kiterjeszhető a teljes genomra. Reménykedtünk a sikerben, hisz' az elsőként megismert két *Fs* mutáció – *Fs(2)D*, és *Fs(1)K1237* – kiváló eszköznek bizonyult. Meglepetésünkre, az általunk izolált 75 *Fs* mutáció között mindössze csak négy olyan volt, amelyek valamelyikét hordozó nőtények nem tojtak petéket, vagy csak néhány torzat, összeesett: *Fs(2)1*, *Fs(2)Ugra<sup>D</sup>*, *Fs(3)Apc<sup>D</sup>* és *Fs(3)Avar<sup>D</sup>* (Erdélyi and Szabad 1989, Szabad et al. 1989). Közülük csak *Fs(2)1* akadályozza az ivarsejt-vonal sejtek életét. *Ugra<sup>D</sup>* és *Apc<sup>D</sup>* a follikuláris sejtek funkcióját

zavarja, *Avar<sup>D</sup>* – mint láttuk – a petevezetékét. *Fs(2)1*, amely a második kromoszóma bal karján van, kiváló eszköznek bizonyult: vele tucatszámú letális, valamint nőstény-steril mutáció hatásait vizsgálták meg a nőstény ősvarsejtekre (Irish and Gelbart 1987, Szabad et al. 1987, Szabad et al. 1988, Clifford and Schüpbach 1989, Szabad et al. 1991, Liu and Jack 1992, Szabad 1998).

Időközben Chou and Perrimon (1996) klónozták *Fs(1)K1237*-et, és transzgének formájában „beékelte” a muslica második és harmadik kromoszómájának mindkét karjába. Sőt, olyan megoldást is alkalmaztak, amely hősokkal indukál mitotikus rekombinációt, feleslegessé téve a röntgensugárzás alkalmazását. Az immáron az egész genomra kiterjesztett, a nőstény ősvarsejtek funkcióját vizsgáló domináns nőstény-steril technika hasznáról dolgozatok százai szólnak.

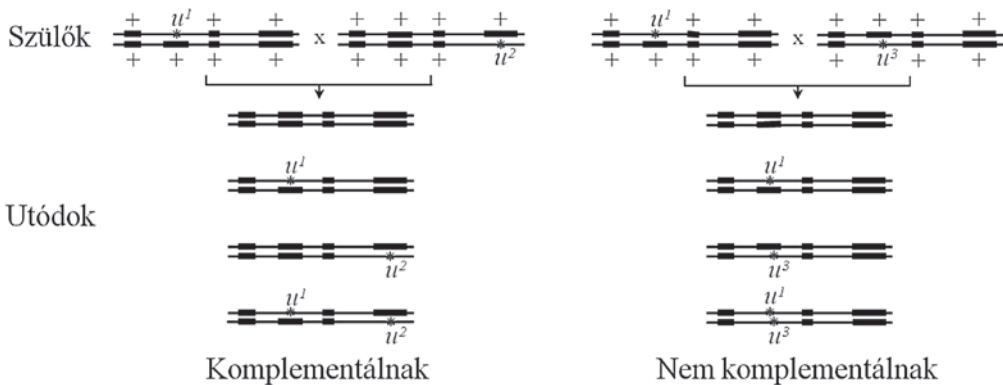
*Ugra<sup>D</sup>* és *Apc<sup>D</sup>* viszont lehetővé tette a domináns nőstény-steril technika kiterjesztését a follikuláris sejtekre, úgy, amint azt a 6. ábra bemutatja. (*Ugra<sup>D</sup>* a második kromoszóma bal, *Apc<sup>D</sup>* a harmadik kromoszóma bal karján van.) *Ugra<sup>D</sup>* és *Apc<sup>D</sup>* esetében röntgensugársággal indukálunk mitotikus rekombinációt, és miközben valamely follikuláris őssejt megszabadul *Ugra<sup>D</sup>*-től (vagy *Apc<sup>D</sup>*-től), homozigótává válik a tanulmányozott letális, vagy recesszív nőstény-steril mutációra. Amennyiben a tanulmányozott mutáció nem befolyásolja a follikuláris sejtek életét, ép peték fejlődnek, amelyekből utódok származnak. Ha ellenben a mutációval azonosított ép gén funkciója fontos a follikuláris sejtek életében nem képződnek peték, vagy bár képződnek peték, bennük nem fejlődnek, vagy abnormálisak az embriók (Szabad et al. 1989, Szabad et al. 1991, Mahone et al. 1995, Szabad 1998, Sapir et al. 1998, Lamnissou and Galanopoulos 2000, Barth et al. 2011).

Az *Ugra<sup>D</sup>/+* és az *Apc<sup>D</sup>/+*, kifejlett nőstényekben indukált, mitotikus rekombináció nyomán képződő *+/+* sejtek, a belőlük származó peték, utódok világosan megmutatták, hogy a petecsövek felső részében follikuláris csírasejtek vannak (4. ábra). Belőlük származnak azok a follikuláris sejtek, amelyek beburkolják a petekezdeményeket, és amelyek hallatlanul fontosak a peték és az utódok képződésében (Szabad and Hoffmann 1989, Szabad et al. 1989).

## Komplementációs analízis

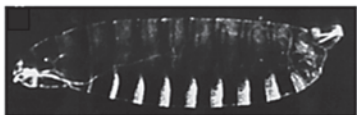
Azt eldöntendő, hogy az *Fs* mutációk mely géneket azonosítják, és hogy esetleg ugyanannak a génnek két, vagy több *Fs* allélját is indukáltuk, a funkcióvesztéses (revertáns, recesszív) allélokkal komplementációs analízist végeztünk. Ha két recesszív allél komplementálja (kiegészíti) egymást, más-más gént azonosítanak (13. ábra). Ha ellenben két allél nem komplementálja egymást, ugyanazt a gént azonosítják. Ez utóbbi esetben a transz-heterozigóta egyedekben a gén funkcióvesztéses állapotára jellemző mutáns fenotípus alakul ki.

A komplementációs analízis alapján derült arra fény, hogy az 51 *Fs(3)* mutáció közül öt a *Toll*, négy az *easter* gént azonosítja (Erdélyi and Szabad 1989). A 24 *Fs(2)* mutáció

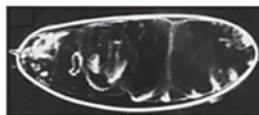


**13. ábra. A komplementációs analízis elvi alapja.** Amennyiben két recesszív mutáció ( $u^1$  és  $u^2$ ) két különböző gén funkcióját szünteti meg, a transz-heterozigóta ( $u^1/u^2$ ) utódok életképesek, fertilisek; a két mutáció komplementálja, kiegészíti egymást. Ha viszont a két mutáció ugyanannak a génnek a funkcióját szünteti meg ( $u^1$  és  $u^3$ ), az ép génfunktó hiányában a transz-heterozigóta ( $u^1/u^3$ ) egyedek jellegzetes mutáns fenotípust mutatnak; a két mutáció nem komplementálja egymást. Az ép, vad típusú allélok jelét (+) csak a szülők esetében tüntettük fel.

Gén	Genotípus						
<i>a</i>	$a^+/a^+$	$a^-/a^-$	$a^+/a^+$	$a^+/a^+$	$a^+/a^+$	$a^-/a^-$	$a^+/a^+$
<i>b</i>	$b^+/b^+$	$b^+/b^+$	$b^-/b^-$	$b^+/b^+$	$B^D/b^+$	$B^D/b^+$	$B^D/b^+$
<i>c</i>	$c^+/c^+$	$c^+/c^+$	$c^+/c^+$	$c^-/c^-$	$c^+/c^+$	$c^+/c^+$	$c^-/c^-$
Fenotípus →	Vadtípusú	dorzalizált	dorzalizált	dorzalizált	Ventralizált	Ventralizált	dorzalizált



Vadtípusú



dorzalizált



Ventralizált

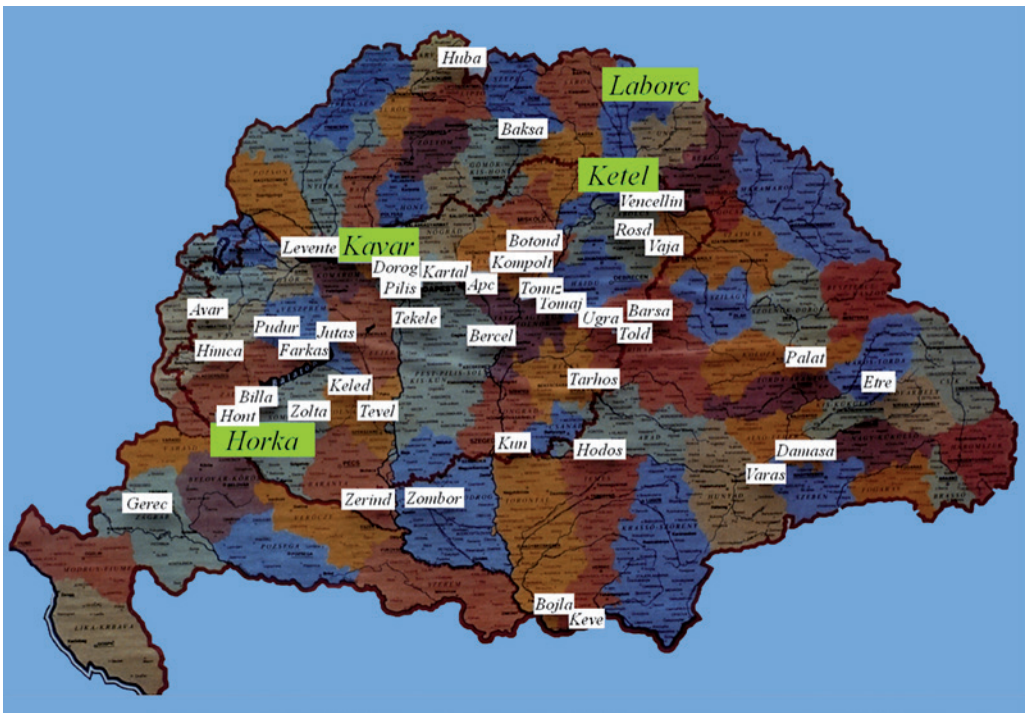
**14. ábra. A genetikai hierarchia megállapítása domináns mutációval.**

Az ép *a*, *b* vagy *c* gén bármelyikének funkcióvesztése nyomán olyan ún. dorzalizált «csupahát» muslica embriók képződnek, amelyek hasoldali sejtjei is a hátoldali fejlődési programot követik: az *a*, *b* és *c* géneknek a hasoldali fejlődési program megvalósításában van szerepük. A *b* gén  $B^D$  domináns negatív mutáns alléja jelenlétében a hátoldali sejtje is a hasoldali programot hajtják végre, ami nyomán ún. ventralizált, „csupahas” embriók képződnek. Minthogy a  $B^D$  allél tulajdonsága  $a^-/a^-$ ;  $B^D/b^+$ ;  $c^+/c^+$  genetikai háttér esetében megnyilvánul, ám  $a^+/a^+$ ;  $B^D/b^+$ ;  $c^-/c^-$  háttérben nem, nyilvánvaló, hogy a három gén funkciójának sorrendje  $a \rightarrow b \rightarrow c$ .

közül négy a *dorsal*, egy pedig a *torso* gént azonosítja (Szabad et al. 1989). A *Toll*, az *easter*, a *dorsal* és a *torso* géneknek a muslica embriók dorzális/ventrális polaritásának meghatározásában, illetve az immunrendszer funkciójában van alapvető szerepe. Molekuláris funkciójukról a FlyBase honlapján (<http://flybase.org/>), illetve szakirodalomban tudhat meg többet az érdeklődő. Mi a *torso*<sup>D4021</sup> mutáció felhasználásával módszert dolgoztunk ki a genetikai hierarchia megállapítására (14. ábra; Klingler et al. 1988).

## A névadó

1989-ben, amikor az *Fs* mutációkról szóló dolgozataink megszületőben voltak úgy tűnt, hogy a *Toll*, *easter*, *dorsal* és *torso* kivételével az *Fs* mutációk ismeretlen géneket azonosítanak. Az *Fs* mutációkat „születésükkor” az EMS-mutagenézis sorszámával, valamint azokon belül az *Fs*-jelöltek betűjével kódoltuk. (Pl. *Fs(3)Horka<sup>D</sup>* jele *12h*, *Fs(3)Laborc<sup>D</sup>*-jé *17c* volt.) Bár a „korai” jelölés laboratóriumi használatra megfelelt, az *Fs* mutációk publikálása előtt nevekkkel illettük őket, amint az a muslica genetikában régóta megszokott. A „keresztelón” Kristó Gyula, Makk Ferenc és Szegfű László (1973 és 1974) kiváló szegedi történészek munkáiban lertünk neveket. Olyan magyar családok nevei között válogattunk, amelyek bár a 14. század kezdetére kihaltak, ám neveik helynevekben fennmaradtak (15. ábra). Arra azonban ügyeltünk, hogy a nevekben ne legyenek kettős mássalhangzók, valamint á, é, í, ó, ö, ő, ú, ü és ű magánhangzók. Bár a névadás sikeres volt, akadtak meglepetések. Előadásaim során gyakran megkérdezték: mi az a vörös vonal a térkép belsejében (15. ábra)? Egyik előadásom után egy izraeli kollégám azt mondta, hogy Ketel héberül lenyazást jelent. Egy chilei kutatótól azt tudtam meg, hogy az ottani egyik bennszülött nyelvben Ketel a mi Hamupipókénk megfelelője... Mégis, ma már néhány régi magyar családnév ismerősen cseng a muslica genetikusok, molekuláris sejtbiológusok körében. (Lásd a Flybase honlapját is: <http://flybase.org/>.)



**15. ábra. Helynevek, amelyek alapján az *Fs* mutációkat elneveztük.**

A zölden kiemelt gének molekuláris funkcióját a műhelyünkben, Szegeden ismertük meg.

És még valami: miután megtudtuk, hogy a mutagenézis során mely gént és hány-szor „találtunk el”, megbecsültük, hogy az *Fs*-é alakítható gének hányad részét azonosítottuk: a harmadik kromoszóma génjeinek mintegy 60, a másodikénak 65-75 százalékát (Erdélyi and Szabad 1989, Szabad et al. 1989). Vagyis maradt még néhány. Az egyiküket (*r<sup>sem</sup>*, vagy *Sevenmaker*) Ernst Hafen, a másikukat (*Pitkin<sup>D</sup>*) Gunter Reuter laboratóriumában indukálták, izolálták Zürichben, illetve Halléban (Brunner et al. 1994, Kuhfittig et al. 2001). Az *Fs* mutációkkal dolgozva olyan tapasztalatokat gyűjtöttünk, amelyek alapján viszonylag egyszerű volt az itt említett két *Fs* mutációt térképezni, belőlük – második mutagenézis során – revertánsokat készíteni, azokkal komplementációs analízist végezni, majd klónozni és megszekvenálni az ép géneket, és a mutáns alléljaikat is. Az *r<sup>sem</sup>* allélból kiindulva a szignál-transzdukciós utak hálózatáról tanultunk új, és izgalmas dolgokat (Brunner et al. 1994). A *Pitkin* (hivatalos nevén *Su(var)3-9<sup>ptm</sup>*) mutáció az egyik olyan gént azonosítja, amely terméke a kromatinszerveződés fontos komponense (Kuhfittig et al. 2001, Ebert et al. 2004).

## Ismét a kezdeti célokról

Az *Fs* mutációk indukálásának, izolálásának egyik célja az volt, hogy azonosítsunk olyan géneket, amelyek funkciója ahhoz szükséges, hogy a megtermékenyített petékben elkezdődjön az embriogenezis. Célunkat elérendő az *Fs* mutációk közül kiválasztottuk azt a néhányat, amelyek bármelyikét hordozó nőstényektől ép peték származnak, és amelyek bár megtermékenyülnek, bennük vagy el sem kezdődik az embriogenezis, vagy a kezdeti lépés után elakad, és elpusztul az embrió. A megközelítést azért találtuk izgalmasnak, mert nem tudhattuk, hogy a kiválasztott *Fs* mutáció a sejtbiológia mely területére fog sodorni bennünket. Kezdeti reménykedésünk bevált: műhelyünk nagyjából húszéves munkálkodása során négy olyan gén molekuláris funkcióját ismertük meg, amelyek sejtbiológia négy területével ismertettek meg bennünket. És nem csak megismertünk négy módfelett izgalmas területet, hanem – azt gondoljuk – hozzá is járultunk fejlődésükhöz. A négy terület a következő.

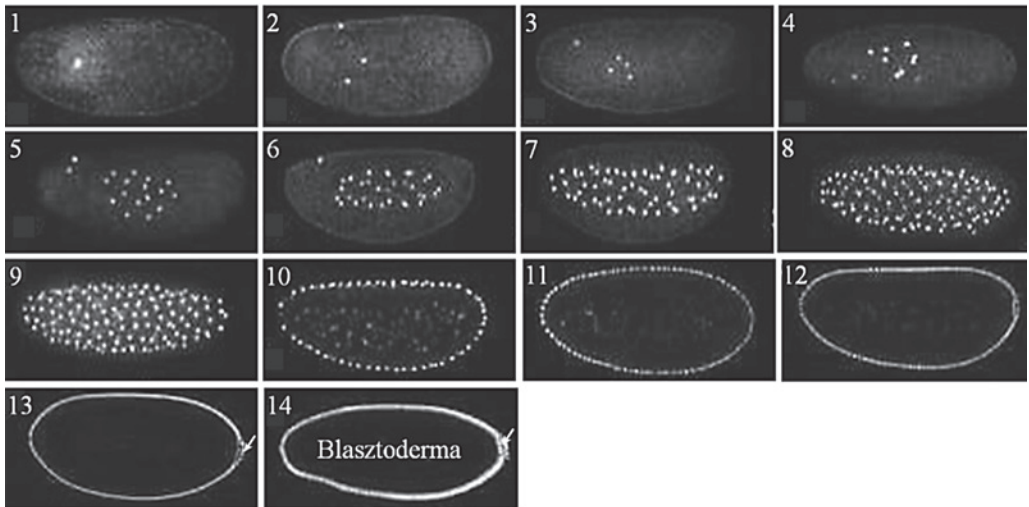
1. *Laborc<sup>D</sup>* azt a *Dhc64C* gént azonosítja, amely a citoplazmatikus dinein nehéz lánccát kódolja. Funkciója – mint kiderült – szükséges a centroszómák képződéséhez, és hogy kapcsolat legyen a replikáció és a centroszóma ciklus között.
2. A *Ketel* gén terméke az importin- $\beta$ , amely – amint megmutattuk – nem csak a sejtmagi fehérje import fontos szereplője, hanem funkciója szükséges a sejtmag-hártya képződéshez, valamint a magorsó kialakulásához is.
3. A *Kavar<sup>D</sup>* allélok azt az  *$\alpha$ Tub67C* gént azonosítják, amely az anyai eredetű, ún.  $\alpha$ 4-tubulint kódolja. Az  $\alpha$ 4-tubulin ahhoz szükséges, hogy a muslica embriogenezis kezdetén gyorsan képződjenek olyan interpoláris mikrotubulusok, amelyek miközben a sejtmag-hártyához tapadnak, a leánycentroszómákat a sejtmag-hártya mentén az átelleni pólusokba tolják, hogy aztán megszervezhessék a magorsók képződését.

4. *Horka<sup>D</sup>* a *lodestar* gént azonosítja. Terméke, a LODESTAR fehérje a helikáz-szerű fehérjék egyike. Funkciója ahhoz szükséges, hogy a leánykromatidákat összetartó kohezin komplexek a kromatinra kerüljenek, és biztosítsák a kromoszómák stabilitását az osztódások folyamán.

## A muslica embriogenezis dióhéjban

Mielőtt áttekintenénk a négy (Laborc, Ketel, Kavar és Horka) történetet, nagy vonalakban ismerjük meg a muslica embriogenezis kezdeti lépéseit. Egy muslica pete lényegében abban a percben termékenyül meg, amelyben valamelyik petefészekből az uterusba érkezik, hogy aztán a nőtényből a külvilágba kerüljön (4. ábra). A spermium részeként érkező centroszóma előbb osztódik, hogy aztán megszervezze az első magosót. (Lásd a címlapon levő ábrát.) Ettől kezdve 8-10 percenként lezajlik egy olyan magosztódás, amely során nem képződnek sejtek, amely ciklusokban csak S és M fázisok vannak. A muslica embrió életének kezdeti szakasza egy szincicium: egyetlen sejt sok-sok sejtmaggal (16. ábra). Az első 9 magosztódás a citoplazma mélyén történik a tizedik osztódás során a magvak a pete kérgi részébe jutnak, ahol három további osztódás történik. Az utolsó megosztódás után a magvak körül sejthártya képződik: kialakul a blasztoderma.

A folyamat különlegessége, hogy az embrió saját génjei csaknem a blasztoderma stádiumig be sem kapcsolnak. Az embriogenezis kezdeti lépéseit, beleértve annak elkezdődését, olyan anyai eredetű mRNS és fehérjemolekulák irányítják, amelyek képződését az anya génjei kódolják, és a peték képződése során válnak a citoplazma részévé.

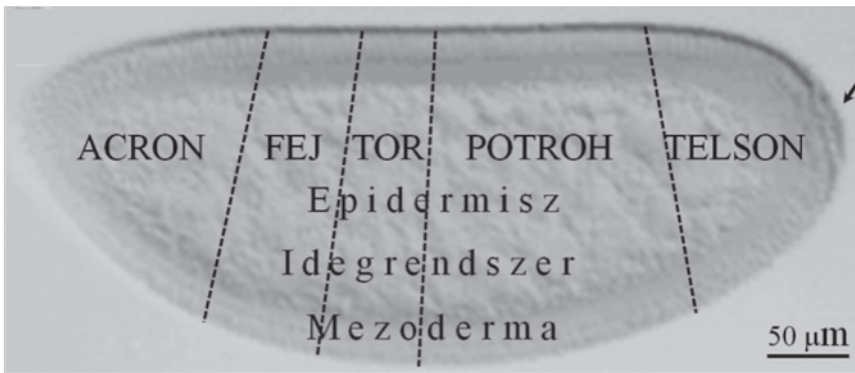


**16. ábra. A muslica embriogenezis kezeti lépései.** A citoplazma világosszürke, a sejtmagvak fehérek. A nyilak az embriók hátulsó végén képződő ősvarsejteket mutatják.



A jelenség nem túl meglepő, ha tudjuk, hogy a muslica nagyjából 16,5 ezer génje közül kb. 60%-nak a terméke mRNS és/vagy fehérjemolekulák formájában benne van a petesejtek citoplazmájában (Szabad 1998). Anyai eredetű géntermékek határozzák meg például azt, hogy hol képződjön a muslica embriók feje, hasa, vagy hogy képződjenek ősvarsejtjei. Az, hogy a blasztoderma stádiumhoz közeledve expresszálni kezdenek az embrió saját génjei nem jelenti azt, hogy az anyai hatás csak addig tart. Nem, nem. Az anyai eredetű molekulák még sokáig részt vesznek a fejlődőben levő muslicák életében. Példaként az importin- $\beta$ -t említjük: az anyai eredetű importin- $\beta$ -molekulák még hat nappal az embriogenezis kezdete után is jelen vannak, és funkcionálnak a muslica bábokban (Villányi et al. 2008a).

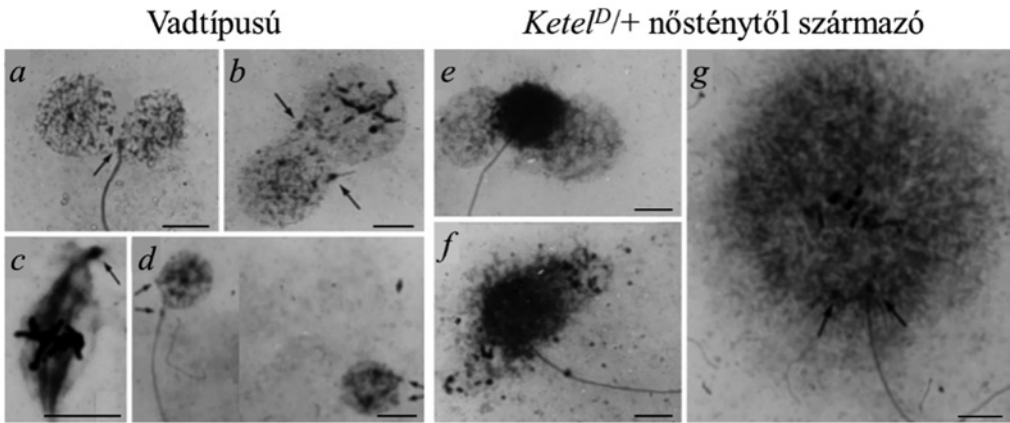
A blasztoderma sejtcsoportjainak fejlődési programja meglehetősen pontos. „Tudják”, hogy mely szegment részei, mely szövettípus fog belőlük kifejlődni. Azt a „térkép”, amely a blasztoderma sejtcsoportok fejlődési programját mutatja sorstérképnek nevezik (17. ábra).



**17. ábra. A muslica blasztoderma-sorstérkép.** A sorstérkép azt ábrázolja, hogy a blasztoderma mely sejtcsoportjaiból a majdani embriók, lárvák és imágók mely testalkotói fejlődnek. Amíg a fej, a tor és a potroh testtájak szelvényezettek, az acron és a telson nem szelvényezett. A nyíl a hátulsó végen képződő ősvarsejtekre mutat.

## A Ketel-történet

A *Ketel<sup>D/+</sup>* nőstények petéibe pillantva roppant érdekes kép tárult szemünk elé (18. ábra). A petékben ugyanúgy egymásra talál a petesejt és a spermium magja, mint a vad típusúakban. A spermiumfarok tövében látszik a centroszóma. Ám amíg a vad típusú embriókban a centroszóma osztódik, és miután a leánycentroszómák a sejtmaghártya ellentétes pólusaiba jutnak megszervezik az első magorsót, addig a *Ketel<sup>D/+</sup>* nőstények petéiben a centroszóma osztódik, ám a leánycentroszómák egymás közelében maradnak, és egy nagy mikrotubulus bojtot képeznek (18. ábra; Tirián et al. 2000). Talán azért nem különülnek el a leánycentroszómák, mert – amint azt a 18f ábra jelzi – szétesik a sejtmaghártya? Az embriogenezis a „bojtos” állapotban véget ér, az embriók elpusztulnak.

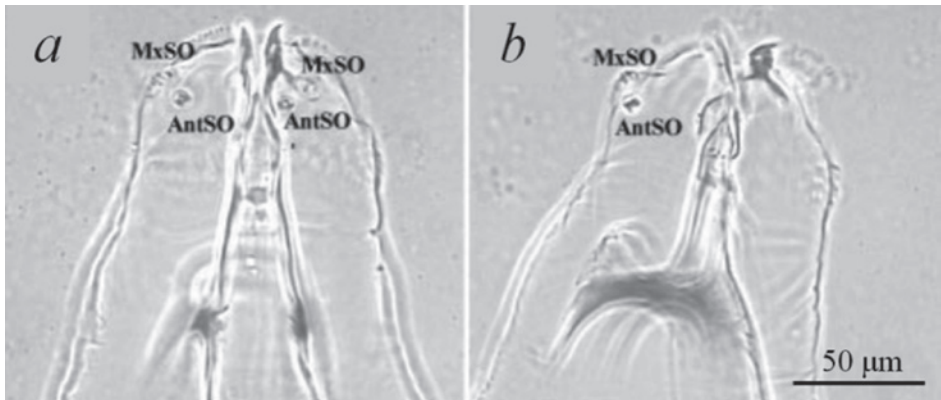


**18. ábra. Az embriogenezis kezdeti lépései vadttípusú (a-d) és *Ketel<sup>D/+</sup>* (e-g) nőstényektől származó petékben.** A nyilak a centroszómákra mutatnak. A hosszú szürke vonal a spermium farka. A vízszintes fekete vonalkák 10  $\mu\text{m}$ -t jeleznek. (Részletes magyarázat a szövegben.)

A mutáns fenotípus módfelett érdekesnek tűnt. Azt gondoltuk, hogy az ép *Ketel<sup>+</sup>* génnek a centroszómák elkülönülésében lehet szerepe, vagy talán a sejtmaghártya életében, amely külső felszíne mentén a leánycentroszómák az ellentétes pólusokba jutnak (Venkei et al. 2006). Tekintettel arra, hogy a két folyamat molekuláris alapjai az 1990-es évek közepén ismeretlenek voltak, úgy határoztunk, hogy a *Ketel<sup>D</sup>* allélokból kiindulva megismerjük az ép *Ketel<sup>+</sup>* gén molekuláris funkcióját. Vajon melyik ép gént azonosítja a négy *Ketel<sup>D</sup>* mutáns allél?

A *Ketel<sup>D</sup>* allélokból akkor lehet kiindulni, és megismerni az ép *Ketel<sup>+</sup>* gén molekuláris funkcióját, ha azok funkcionyeréses természetűek. (Zárójelben említem, hogy a 24 *Fs(2)* allél között négy volt *Ketel<sup>D</sup>*; Szabad et al. 1989, Erdélyi et al. 1997. Minthogy más-más EMS-mutagenézis kísérletből származtak, nem lehettek egyetlen mutáció kópiái.) A *Ketel<sup>D</sup>* allélok természetét eldöntendő *Ketel<sup>D/+</sup>* nőstények petéiből egy kevés (kb. 60 pikoliter) citoplazmát gyűjtöttünk vékony üveg tűcskével, és fiatal vadttípusú embriókba injektáltuk. Oda, ahol azok a sejtek fognak képződni, amelyekből a majdani lárva fején két jellegzetes érzékszerv fejlődik. Minthogy a beinjektált embriókból olyan lárvák fejlődtek, amelyekben nem alakultak ki a jellegzetes érzékszervek arra következtettünk, hogy a *Ketel<sup>D/+</sup>* nőstények petéinek citoplazmája mérgező, vagyis a *Ketel<sup>D</sup>* allélok funkcionyeréses típusúak (19. ábra; Tirián et al. 2000). Ha domináns negatívak is, van értelme belevágni az ép *Ketel<sup>+</sup>* gén molekuláris szintű vizsgálatába.

Azt, hogy a *Ketel<sup>D</sup>* allélok valóban domináns negatív természetűek, a *Ketel<sup>D/+/+</sup>* nőstények mutatták meg: petéikben nemcsak tovább fejlődtek az embriók a fentebb említett bojtos állapotnál, hanem ezer pete közül átlag háromból utódok származtak. Lévén a *Ketel<sup>D</sup>* allélok domináns negatív természetűek, belevágtunk az ép *Ketel<sup>+</sup>* gén azonosításába, molekuláris funkciójának megismerésébe.



**19. ábra. Két muslica lárva fejkutikulája.** A lárva olyan fiatal embriókból fejlődtek, amelyekbe vad típusú (a), illetve *Ketel<sup>D/+</sup>* nőtényőtől származó (b) pete citoplazmáját injektáltuk. Amíg a vad típusú citoplazma injekciójának nincs hatása a fej jellegzetes érzékszerveinek (MxSO és AntSO) kifejlődésére, a *Ketel<sup>D/+</sup>* eredetű pete citoplazma megakadályozta az érzékszervek kifejlődését azon az oldalon, ahova injektáltuk.

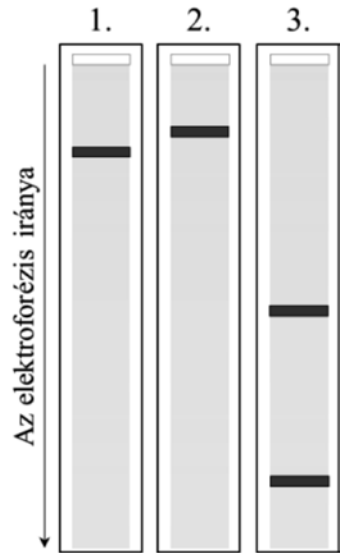
### A *ketel<sup>r</sup>*-revertánsok

Röntgensugárzással és EMS-sel a négy *Ketel<sup>D</sup>* mutációból kiindulva 27 *ketel<sup>r</sup>* revertáns (funkcióvesztéses, recesszív) allélt indukáltunk, izoláltunk (Erdélyi et al. 1997). A *ketel<sup>r</sup>* allélok transz-heterozigóta formában letálisak, és a második lárva stádiumban pusztulnak el. (A kérdést, hogy addig miként fejlődhetnek el, lentebb válaszoljuk meg.) A következő lépésben a röntgensugárzással indukált *ketel<sup>rX</sup>* allélok nyálmirigyeinek óriáskromoszómáit annak reményében vizsgáltuk meg, hogy lesznek köztük olyanok, amelyek kromoszómatorések és -átrendeződések nyomán képződtek. A közös töréspont nemcsak megmutatja az ép *Ketel<sup>+</sup>* gén helyét, hanem lehetőséget ad annak molekuláris klónozására is. Az óriáskromoszómák vizsgálata megmutatta, hogy az ép *Ketel<sup>+</sup>* gén a genom 38E5-38E6 helyén van, a második kromoszóma bal karján (Lippai et al. 2000).

Megismerve az ép *Ketel<sup>+</sup>* gén helyét *Ketel<sup>D/+/+</sup>* nőtényeket készíthettünk, és tudtuk meg – amint az imént említettem –, hogy a *Ketel<sup>D</sup>* allélok domináns negatív természetűek. A *ketel<sup>r</sup>* revertáns allélokat néhány további kérdés megválaszolására is használtuk, amint azt lentebb olvashatja az érdeklődő.

### A *Ketel<sup>+</sup>* gén az *Importin-β* képződését kódolja

Annak tudatában vágunk bele az ép *Ketel<sup>+</sup>* gén klónozásába, molekuláris funkciójának megismerésébe, hogy az a 38E5-38E6 helyen van. A klónozás módszere az ún. „kromoszóma séta” (angolul chromosomal walk) volt: olyan rövid, egymással átfedő DNS-szakaszokat – ún. próba DNS-eket – jelöltünk meg <sup>32</sup>P-vel, amelyek a 38E5-38E6 környékéről származtak, és addig „sétáltunk”, ameddig a próba DNS már része volt a



**20. ábra. A Southern hibridizáció sematikus ábrázolása.** A három sávban valamely *ketel<sup>IX</sup>/-* lárvákból származó, restriktíós enzimmel emésztett, különféle hosszúságú és egyszálú DNS-molekulák vannak nitrocellulóz laphoz kötve. A három sávhoz három DNS-próbával hibridizáltunk. Ha a DNS-próba nem érinti azt a töréspontot, amely „eltörte” az ép *Ketel<sup>I+</sup>* gént és a *ketel<sup>IX</sup>* allél képződéséhez vezetett, a hibridizáció során csak egyetlen csík képződik (1. és 2. sávok). Ha viszont a töréspont a próba DNS területére esik, két csík képződik, jelezve, hogy a próba DNS része a *Ketel<sup>I+</sup>* génnek.

*Ketel<sup>I+</sup>* génnek. A próba DNS-ekkel Southern-hibridizációk<sup>3</sup> sorozatát végeztük olyan DNS-mintákon, amelyek *ketel<sup>IX</sup>/-* lárvákból származtak. (Itt *ketel<sup>IX</sup>* egy olyan, röntgensugárral indukált allélt jelöl, amely egyik töréspontja az ép *Ketel<sup>I+</sup>* génben volt, a – jel pedig egy olyan deficienciát, amely eltávolítja a *Ketel<sup>I+</sup>* gént és néhány szomszédját is; Erdélyi et al. 1997.) A *ketel<sup>IX</sup>/-* DNS-t valamely restriktíós enzimmel megemésztettük, és a <sup>32</sup>P-jelölt DNS-próbákkal – hibridizációk során – addig lépegettünk, ameddig a Southern hibridizáció eredményeként olyan DNS-szakaszra leltünk, amely része volt a *Ketel<sup>I+</sup>* génnek (20. ábra).

Miután megszekvenáltuk azt a DNS-fragmentet, amelyről a Southern hibridizációk alapján kiderült, hogy a *Ketel<sup>I+</sup>* gén része, megtudtuk, hogy a muslica *Ketel<sup>I+</sup>* génje az Importin-β (Imp-β) fehérjét kódolja, a sejtmagi fehérjeimport fontos résztvevőjét (Lippai et al. 2000, Tirián et al. 2001). Az 1990-es évek közepén, amikor a *Ketel<sup>I+</sup>* gént klónoztuk, már ismert volt Imp-β, és a sejtmagi transzport folyamatok mechanizmusa is (21. ábra; Stewart 2007, McPherson et al. 2015). Olyannyira, hogy a sejten belüli transzport folyamatok felderítéséért Günter Blobel 1999-ben kiérdemelte a Nobel-díjat.

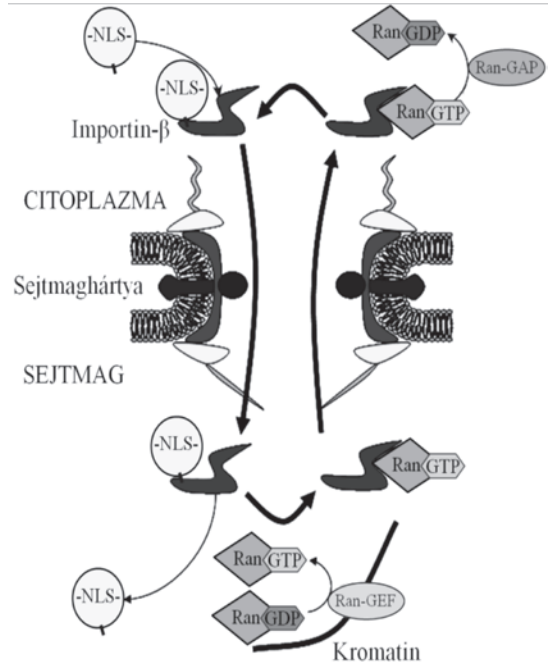
A „felfedezés”, hogy ti. a *Ketel<sup>I+</sup>* gén Imp-β képződést kódol egyrészt elszomorított bennünket (mert már ismert funkciójú génre bukkantunk), másrészt bizakodóvá tett. Minthogy a 876 aminosavból álló 97 kilodalton tömegű muslica Imp-β aminosav sorrendje 60,3 százalékban azonos és 78,2 százalékban hasonló természetű az ember Imp-β-jával (Lippai et al. 2000), használhatónak reméltük azt a digitoninnal permeabilizált HeLa sejt technikát, amelyet a sejtmagi fehérje import tanulmányozására mások kidolgoztak,

<sup>3</sup> – Hibridizáció: komplementer nukleinsav szálak egyesülése.

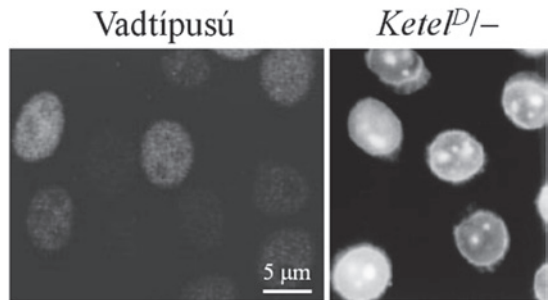
– Southern hibridizáció: eljárás, amely során nitrocellulóz, vagy nylon laphoz rögzített, különféle hosszúságú egyszálú DNS-fragmentek valamelyike egyesül a komplementer, valamilyen módon (pl. <sup>32</sup>P-vel) megjelölt egyszálú DNS-szállal, a „próba” DNS-sel.

használtak. (A digitonin a piros gyűszűvirágból – *Digitalis purpurea* – izolálható szteroid típusú detergens. Vele permeabilizálható a sejtthártya, a sejtek citoplazmájából kimosható sok fehérjeféleség. HeLa pedig tenyészetben tartott méhnyakrák eredetű sejtek jele.) Azt gondoltuk, hogy a *Kete<sup>D</sup>* allélok úgy okozzák a *Kete<sup>D/+</sup>* nőstényektől származó embriók pusztulását, hogy a kódolt mutáns Imp- $\beta$ -molekulák megakadályozzák a sejtmagi fehérje importot. Ugyanakkor kételkedtünk is: miként lehetnek életképesek a *Kete<sup>D/+</sup>* muslicák, hisz' minden sejtjükben hordozzák a *Kete<sup>D</sup>* allélt? Vagy talán arról van szó, hogy a *Kete<sup>D</sup>* allélok által kódolt mutáns Imp- $\beta$ -nak csak az anyai hatású funkciója van?

A kérdéseket megválaszolandó vad típusú muslica *Drosophila* petefészek kivonatot készítettünk, és megvizsgáltuk, hogy segíti, vagy sem a sejtmagi fehérjeimportot a digitoninnal permeabilizált HeLa sejtek magjába. Abban a kísérletben, amelyben a digitoninnal permeabilizált HeLa sejtekhez vad típusú muslica petefészek kivonátát, valamint NLS-fikoeritrin (NLS-PE), egy vörösen fluoreszkáló fehérjeféleséget adtunk, az NLS-PE molekulák importálódtak a sejtmagba, és kilivágították azokat (22. ábra). Fontos eredmény született: a muslica petefészek kivonat tartalmazza mindazokat a komponenseket, amelyek HeLa sejtekben a sejtmagi fehérje importhoz szükségesek. Ezután leírhatatlan váratossággal kezdtünk abba a kísérletbe, amelyben *Kete<sup>D/-</sup>* nőstények petefészek kivonátát adtuk HeLa sejtekhez, természetesen NLS-PE-vel



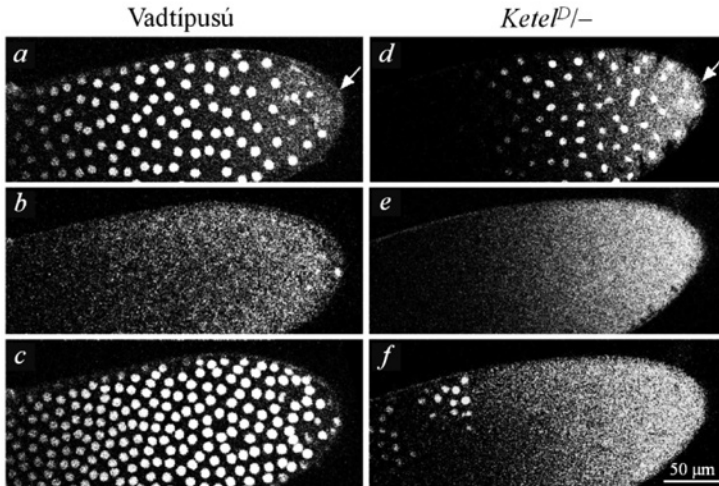
**21. ábra. Az Importin- $\beta$  szerepe a sejtmagi fehérjeimportban.** Az Imp- $\beta$  közvetlenül vagy közvetve kapcsolódik az NLS-t (angolul: nuclear localisation signal) „címkét” tartalmazó fehérjemolekulákkal. Az Imp- $\beta$ -NLS-fehérje komplex a sejtmagpórus komplexek valamelyikén át a sejtmagba importálódik. Itt, miközben az Imp- $\beta$  a Ran-GTP-hez „pártol”, az NLS-tartalmú fehérje szabaddá válik. Az Imp- $\beta$ -Ran-GTP komplex a citoplazmába exportálódik, ahol Ran-GAP hatására Ran-GDP képződik, miközben az Imp- $\beta$  készen áll a következő importciklusra. A sejtmagba importálódott Ran-GDP a kromatinhoz kötött Ran-GEF hatására alakul Ran-GTP-vé.



**22. ábra. A vad típusú és a *Kete<sup>D/-</sup>* nőstények petefészek kivonatai egyformán hatékonyan segítik az NLS-fikoeritrin importját a digitoninnal permeabilizált HeLa sejtek magjába**

egyetemben. Azt gondoltuk, hogy a *Ketel<sup>D/-</sup>* nőtények petefészek kivonata megakadályozza a sejtmagi fehérjeimportot. Hegyeztük a tollunkat, hogy írjuk a dolgozatot! Hogy biztosak legyünk dolgunkban, olyan *Ketel<sup>D/-</sup>* nőtényekből készítettünk petefészek kivonatot, amelyek nem hordozták az ép *Ketel<sup>+</sup>* gént. Nos, a kísérlet eredménye kiábrándító volt: *Ketel<sup>D/-</sup>* nőtények petefészek kivonata épen olyan hatásosan segítette az NLS-PE importját a sejtmagba, mint a vad típusú petefészek kivonat. Az eredmény kételyekkel töltötte el kis csoportunkat. Talán nem is az Imp-t kódoló gént klónoztuk meg, és értelmetlenül dolgoztunk, morfondírozott Tirián Laci és Timinszky Gyula, két kiváló doktorandusz hallgató. Azt fontolgatták, hogy emelik kalapjukat, és elköszönnek. Szerencsére, vagy inkább a következő kísérletnek köszönhetően maradtak.

A kontrollkísérletben vad típusú pete citoplazmához NLS-PE-t kevertünk, majd injektáltuk vad típusú muslica embriókba. Amint várható volt, az NLS-PE molekulák a sejtmagvakba importálódtak, és kivilágították azokat (23. ábra). Aztán elkövetkezett egy magosztódás, amely során az NLS-PE molekulák a citoplazmában világitottak. Néhány további perc multán az NLS-PE molekulák a frissiben képződött, immáron megduplázódott számú magvakba importálódtak, és kivilágították őket (23. ábra). Ezután *Ketel<sup>D/-</sup>* nőtényektől származó peték citoplazmájához kevertünk NLS-PE-t, és injektáltuk vad típusú embriókba. A HeLa sejtekkel végzet kísérlet alapján számítottunk arra, hogy az NLS-PE molekulák a sejtmagvakba importálódnak, és kivilágítják azokat. A történések megfeleltek várakozásunknak: az NLS-PE molekulák a magvakba importálódtak, azok fényesen fluoreszkáltak (23d. ábra). Hamarosan elkövetkezett a magosztódás, amely során az NLS-PE molekulák a citoplazmába jutottak. Ezután örömteli percek következtek: miközben az embrió abban a részében nem képződtek magvak, amely *Ketel<sup>D/-</sup>* nős-

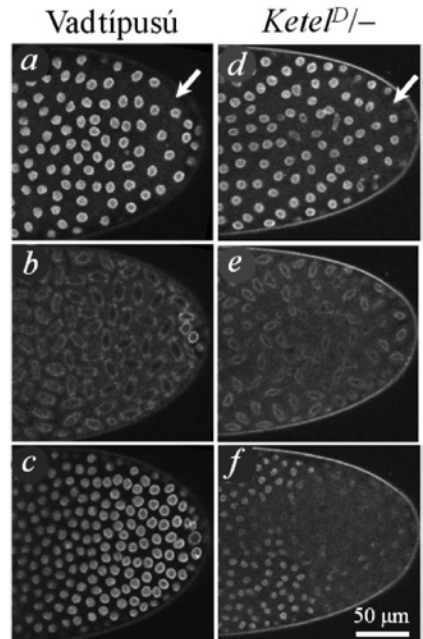


**23. ábra.** NLS-fikoeritin tartalmazó vad típusú (a, b és c), illetve *Ketel<sup>D/-</sup>* nőtényektől (d, e és f) származó peték citoplazmájának hatása muslica embriók osztódó magjaira. A citoplazma injekcióját a  $\swarrow$ -lal jelölt helyen adtuk. A fényes pöttyök az NLS-PE-vel kivilágított magvakat jelölik. (Magyarázat a szövegben.)

tény petéjéből származó citoplazmát tartalmazta, a távolabbi helyeken – ahová a kis NLS-PE molekulák el tudtak diffundálni – képződtek magvak, és azok ki is voltak világítva (23f ábra). A megfigyelés azt jelenti, hogy Imp- $\beta$ -ra nem csak a sejtmagi fehérje importban van szükség, hanem a sejtmaghártya kialakulásához is a mitózis végén. Nagyszerű, páratlan eredmény: az Imp- $\beta$  új funkcióját ismertük meg!

Azt, hogy az Imp- $\beta$  funkciója valóban szükséges a sejtmaghártya képződéshez a mitózis végén úgy bizonyítottuk, hogy vad típusú, illetve *Ketel<sup>D/-</sup>* nőtény petéjéből származó citoplazmát injektáltunk olyan embriókba, amelyek sejtmagjainak bélést lamin-GFP molekulák világították ki. (GFP, a zölden fluoreszkáló protein a lamin-GFP molekulák része volt; lásd Gáspár és Szabad 2008.) A vad típusú citoplazma injekciója nem befolyásolta a sejtmagvak viselkedését: a kivilágított béléstű sejtmagvak lebomlottak, majd újraalakultak (24. ábra). A *Ketel<sup>D/-</sup>* eredetű pete citoplazma injekciója nyomán viszont elmaradt a sejtmaghártya képződés. Vagyis megerősítést nyert a fenti megállapítás: az Imp- $\beta$  funkciója nem csak a sejtmagi fehérje importhoz, hanem a sejtmaghártya képződéshez is szükséges (Timinszky et al. 2002).

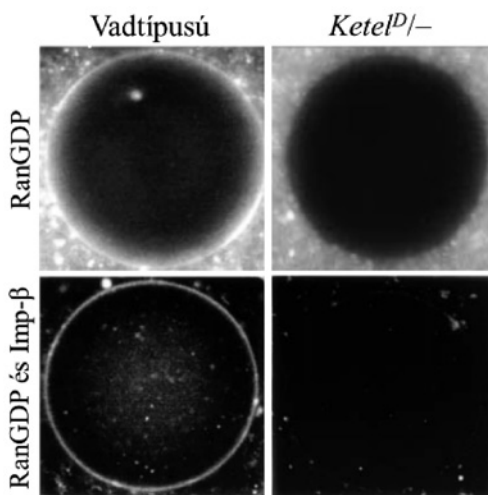
(Zárójelben és csupa apró betűvel írom, hogy a felfedezésünket leíró kéziratunkat egy jeles folyóiratba küldtük el közlésre. Kisvártatva udvarias levél kíséretében visszakaptuk a kéziratot: a szerkesztő a bírálók „érdekes” véleménye alapján nem közölte dolgozatunkat. Ahogy ilyenkor szokás, a kéziratot elküldtük egy másik folyóiratba, ahol megjelent, és „szépen” hivatkoznak rá. A sors úgy hozta, hogy néhány hónap múltán találkoztam a szerkesztővel, aki – miközben egy kellemes vacsora közben beszélgettük – elmondta, hogy meglepődtek, amikor a Balkán pereméről kaptak egy érdekes kéziratot az importin- $\beta$  szerepéről a sejtmaghártya képződésben. Igen, az a mi kéziratunk volt. „El tudod képzelni, János, hogy a Nobel-díjas Günter Blobel nem vette volna észre az importin- $\beta$  ezen funkcióját?” Igen, el, hisz’ ő digitoninnal permeabilizált sejtekkel dolgozott. Olyanokkal, amelyek sohasem osztódnak, nem bomlik le és képződik újra a sejtmaghártyájuk. A szerkesztő sajnálta, hogy nem ismerte egyikünket sem, és hogy nem közölte dolgozatunkat. Mi pedig levontuk a tanulságot: árulni kell a portékát, és benne kell élni a világ tudományos forgatagában.)



**24. ábra.** A lamin-GFP-vel kivilágított sejtmaghártya „viselkedése” vad típusú (a, b és c), valamint *Ketel<sup>D/-</sup>* nőtény petéjéből származó citoplazma injekcióját követően (d, e és f). A citoplazmát olyan muslica embriókba injektáltuk (↙), amelyekben GFP-lamin fehérje molekulák világították ki a sejtmaghártya bélést. Említést érdemel, hogy a *Drosophila* sejtmaghártya csak részlegesen bomlik le a mitózis során. Az ábra b és e részén halványan fluoreszkáló alakzatok a mitózist „átvészelő” sejtmaghártya részek.

## Imp- $\beta$ és sejtmaghártya képződés

Hogy Imp- $\beta$  valóban szükséges a sejtmaghártya képződéshez, további kísérletekben bizonyítottuk (Tirián et al. 2003). 2000-ben jelent meg egy dolgozat, amely leírta, hogy miként lehet *in vitro* nyomon követni a sejtmaghártya képződést szefaróz gyöngyöcskéken (Zhang and Clarke 2000). (A szefaróz gyöngyöcskék keresztül-kasul összekötött agaróz poliszacharid molekulákból állnak. A gyöngyöcskék felszínéhez kovalensen köthetők fehérjemolekulák.) Az első kísérletben – ahogy azt Zhang és Clarke (2000) javasolta – RanGDP molekulákat kötöttünk szefaróz gyöngyöcskék felszínére, és azt tanulmányoztuk, hogy képződik maghártya a gyöngyöcskék felszínén, vagy sem. (RanGDP a sejtmagi fehérje import fontos komponense;



25. ábra. Maghártya képződés RanGDP-vel burkolt szefaróz gyöngyöcskék körül vadtípusú, illetve *Ketel<sup>D/-</sup>* nőstények petéinek citoplazmájában.

21. ábra.) A gyöngyöcskéket vadtípusú, illetve *Ketel<sup>D/-</sup>* nőstények petéiből származó citoplazmában inkubáltuk két órán át. Amint a 25. ábra mutatja, amíg a vadtípusú pete citoplazmában képződött maghártya a gyöngyöcskék körül, a *Ketel<sup>D/-</sup>* nőstények petéinek citoplazmájában nem. (A sejtmaghártya valódi volt, benne sejtmagpórus komplexekkel, amelyeken keresztül folyt a sejtmagi fehérje import; Tirián et al. 2003.) Amikor a petekivonathoz Imp- $\beta$ -t is adtunk, a maghártya képződés percek alatt megtörtént. Ám ha a kivonat mutáns Imp- $\beta$ -t is tartalmazott, nem képződött maghártya (25. ábra). A kísérlet eredménye összhangban van a fenti megállapítással: a *Ketel<sup>D</sup>*-kódolt mutáns Imp- $\beta$  gátolja a sejtmaghártya képződést.

A következő kísérletben Imp- $\beta$ -val, illetve a *Ketel<sup>D</sup>*-kódolt mutáns P446L-Imp- $\beta$ -val vontunk be szefaróz gyöngyöcskéket, és azt tanulmányoztuk, hogy képződik-e maghártya a gyöngyöcskék körül vadtípusú nőstények petéinek citoplazmájában, vagy sem. Nos, amint a 26. ábra mutatja, az Imp- $\beta$ -val, illetve a P446L-Imp- $\beta$ -val bevont gyöngyöcskéken is képződik maghártya, és ráadásul egyforma gyorsan. (Mondogatta is Timinszky Gyula, hogy bár a kísérlet ritka nagy ostobaságnak tűnt, gondolkodtató eredményre vezetett.) Miként lehetséges, hogy ha a citoplazmában van a P446L-Imp- $\beta$  akadályozza a sejtmaghártya képződést, ám a szefaróz gyöngyök felszínén meg segíti?

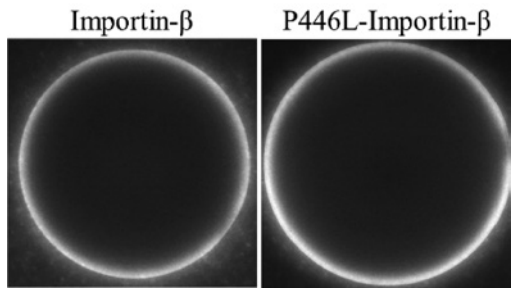
Mielőtt a rejtélyre fény derülne, elmondom, hogy az egyik *Ketel<sup>D</sup>* allélt megszekvenálva kiderült, hogy a mutáció alapja a *Ketel<sup>+</sup>* gén 4114. helyén levő C≡G bázispár cseréje T=A-ra, aminek a következménye a prolin<sup>446</sup> → leucin aminosav csere (Timinszky et al. 2002). (Innen a P446L-Imp- $\beta$  jelölés.) Sőt, az is nyilvánvalóvá vált, hogy a négy *Ketel<sup>D</sup>* allél közül háromnak ugyanaz a C≡G → T=A bázispár csere az oka a *Ketel<sup>+</sup>* gén 4114. helyén.



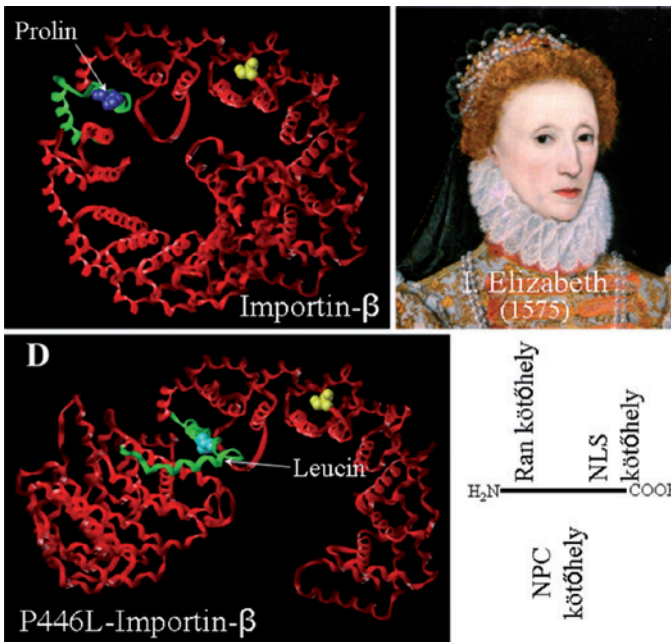
(A három *Ketel<sup>D</sup>* allél nem egy mutáció három kópiája. Független mutagenézisek „termékei”.)

A muslica *Imp-β* 876 aminosavból áll. (Az emberé 884-ból.) A 876 aminosav 19 ún. HEAT motívumot alkot, amelyek spanyolgallér-szerűen vannak elrendezve (27. ábra). A 446. prolin szerepe kulcsfontosságú az *Imp-β* molekulák életében: sarokpánt szerepet tölt be, miközben a molekula alakja változik a sejtmagi fehérje import során. A prolin<sup>446</sup> → leucin aminosav csere nyomán két szomszédos α-hélix egyesült, ami miatt a P446L-*Imp-β* alakja rögzült, és egyben elvesztette a RanGTP-t kötő képességét (27. ábra; Timinszky et al. 2002). Ám más fehérjeféleségeket továbbra is tud kötni.

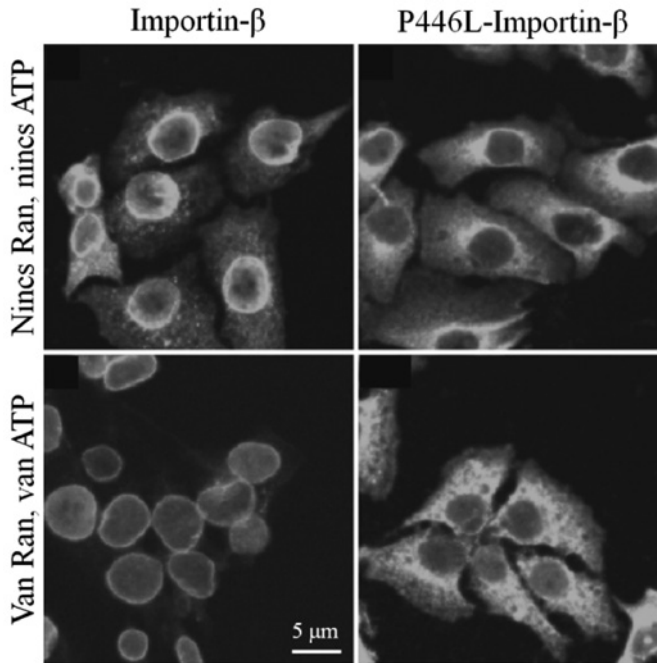
A P446L-*Imp-β* különös viselkedése, hogy ti. ha a citoplazmában van, megakadályozza a sejtmaghártya képződést, ám szefaróz gyöngyöcskék felszínén segíti, további kísérletekre ösztökélte csapatunkat. Anti-*Imp-β* ellenanyagot készítettünk (amely az *Imp-β*-t, és a P446L-*Imp-β*-t egyaránt felismeri), és arra használtuk, hogy meglássuk:



26. ábra. Az *Imp-β*-val, illetve a P446L-*Imp-β*-val burkolt szefaróz gyöngyöcskék felszínén egyaránt képződik maghártya vadtípusú muslica peték citoplazmájában.



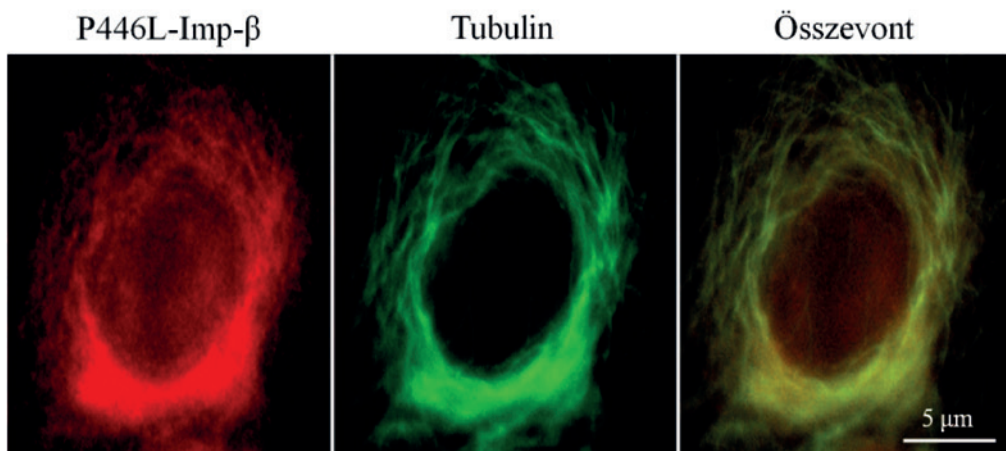
27. ábra. Az *Imp-β* és a P446L-*Imp-β* számítógépes modellje. Az *Imp-β*-t alkotó aminosavak 19 ún. HEAT motívumot képeznek, egyenként csigavonalban feltekeredett szakaszokkal. (Hasonlóan ahhoz, amint a spanyol gallér fodrai vannak elrendezve.) A prolin<sup>446</sup> → leucin aminosav csere következtében megváltozott a molekula szerkezete, és elvesztette Ran-GTP-t kötő képességét. NPC = sejtmagpórus komplex.



**28. ábra.** Az Imp- $\beta$  és a P446L-Imp- $\beta$  helye digitoninnal permeabilizált sejtekben Ran (és a sejtmagi fehérje importban résztvevő társak) valamint ATP hiányában, illetve jelenlétében.  
(Magyarázat a szövegben.)

hol van az ép és a P446L-Imp- $\beta$  a digitoninnal permeabilizált HeLa sejtekben (28. ábra; Tirián et al. 2003). Ha sem Ran-t (és a sejtmagi fehérje importban részt vevő társait), sem ATP-t nem adtunk a sejtekhez, az Imp- $\beta$  molekulák zöme a sejtmaghártya mentén gyülekszik. Ha Ran-t (és társait), valamint ATP-t is adunk a sejtekhez, az Imp- $\beta$  molekulák zöme – amint várható – a sejtmaghártyában (valójában a sejtmagpórus komplexekben), illetve a sejtmagban bukkan fel (28. ábra; Tirián et al. 2003). Ran és ATP hiányában a P446L-Imp- $\beta$  molekulák – az Imp- $\beta$ -khoz hasonlóan – a sejtmaghártya környékén halmozódnak fel. Ran és ATP jelenlétében az P446L-Imp- $\beta$  molekulák zöme a citoplazmában oszlik el, és nem a sejtmaghártyában, vagy a sejtmagban (28. ábra). Minthogy ez utóbbi mintázat kísértetiesen emlékeztetett bennünket a mikrotubulusok eloszlására, megvizsgáltuk, hogy mi a viszonya a P446L-Imp- $\beta$  molekuláknak és a mikrotubulusoknak a digitoninnal permeabilizált HeLa sejtekben. Olyan körülmények között tettük láthatóvá a P446L-Imp- $\beta$  molekulákat, és a mikrotubulusokat, amelyekben adottak a feltételek a sejtmagi fehérje importhoz.

Minthogy a P446L-Imp- $\beta$ -ről és a mikrotubulusokról készült optikai metszetek tökéletesen fedik egymást nyilvánvalóvá vált, hogy a P446L-Imp- $\beta$  molekulák a mikrotubulusokhoz kötődtek (29. ábra; Tirián et al. 2003). Lényegében arra derítettünk fényt, hogy a P446L-Imp- $\beta$  – csakúgy, mint az Imp- $\beta$  – kapcsolódhat a mikrotubulusokhoz. (Az Imp- $\beta$  és a mikrotubulusok kapcsolatáról a Tirián et al. 2003



**29. ábra.** P446L-Imp- $\beta$  és a mikrotubulusok olyan digitoninnal permeabilizált HeLa sejtben, amelyben minden feltétel adott volt a sejtmagi fehérje importhoz. (Amint a 28. ábra jobboldali alsó képén látható.) (Magyarázat a szövegben.)

dolgozat szól részletesen.) Csakhogy amíg az Imp- $\beta$ -molekulák RanGTP-vel kapcsolódva leválnak a mikrotubulusokól, a P446L-Imp- $\beta$  – minthogy elvesztette RanGTP-t kötő képességét – a mikrotubulusokhoz kötve marad, és stabilizálja azokat. És minthogy mindeközben a P446L-Imp- $\beta$  a nukleoporinok (a sejtmagpórus komplexeket alkotó fehérjék) egyikével-másikával is kapcsolódik, azokat „kivonja a forgalomból”, ami miatt elmarad a sejtmaghártya képződés (Tirián et al. 2003).

Eredményeink alapján modellt dolgoztunk ki a sejtmaghártya képződésre (Tirián et al. 2003). A modell lényege az, hogy az Imp- $\beta$ -molekulák részt vesznek azoknak a nukleoporinoknak a kromatinhoz történő szállításában, amelyek nukleoporinok kristályosodási gócként funkcionálnak a sejtmaghártya kialakulása folyamán. És minthogy a sejtmaghártya az felszín, amely mentén az interpoláris mikrotubulusok a leánycentroszómákat az átelleni pólusokba tolják (Venkei et al. 2006), és minthogy a P446L-Imp- $\beta$  megakadályozza a sejtmaghártya képződést immáron érthető a 18. ábrán bemutatott jelenség: a *Ketel<sup>D</sup>* nőtények petéiben, sejtmaghártya hiányában az egymás szomszédságában rekedt leánycentroszómák nem különülnek el, mikrotubulus pamacsokat képeznek.

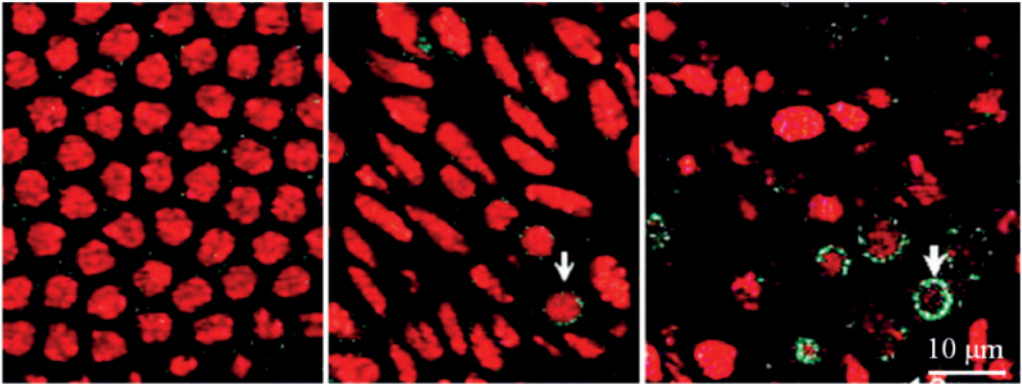
### *Hogyan lehetnek életképesek a *Ketel<sup>D</sup>/+* muslicák?*

A fentiek alapján nyilvánvaló, hogy a *Ketel<sup>D</sup>*-kódolt P446L-Imp- $\beta$  toxikus, elpusztítja a *Ketel<sup>D</sup>/+* nőtények embrióit, köztük a *+/+* genotípusúakat is. Adódik a kérdés: miként lehetnek életképesek a *Ketel<sup>D</sup>/+* muslicák, amelyek *+/+* nőtények és *Ketel<sup>D</sup>/+* hímek utódai? Talán úgy, hogy az apai eredetű *Ketel<sup>D</sup>* allél az embriogenezis korai szakaszában nem expresszálódik, és nem tudja kifejteni áldatlan hatását? A kérdést megválaszolandó megvizsgáltuk, hogy mikor bukkannak fel az embriogenezis folyamán az apai eredetű Imp- $\beta$  molekulák, amelyeket – hogy láthassuk őket – GFP-vel világítottunk ki. Amint a 30. ábra mutatja, ez az időpont a korai gasztruláció alatt nagyjából négy órával az emb-

Blasztoderma

Korai gasztruláció

Kései gasztruláció



**30. ábra.** A zigóta apai eredetű *ketel<sup>GFP</sup>* génje a korai gasztruláció során kezd expresszálódni. A kromatint vörös fluoreszkáló hiszton-RFP molekulák világítják ki. Azok az Imp- $\beta$  molekulák, amelyek képződését a zigóta apai eredetű *ketel<sup>GFP</sup>* génje kódolja zölden fluoreszkálnak, és kivilágítják a sejtmagpórus komplexeket ( $\downarrow$ ). Az Imp- $\beta$ -GFP-molekulák négy órával az embriogenezis kezdete után, a gasztruláció során bukkannak fel.

riogenezis kezdete után következik el (Villányi et al. 2008a). Minthogy az Imp- $\beta$ -GFP és a P446L-Imp- $\beta$  képződését ugyanaz a promóter szabályozza (Villányi et al. 2008b), és az apai eredetű P446L-Imp- $\beta$  nem toxikus, nyilvánvaló, hogy csak az anyai eredetű P446L-Imp- $\beta$  mérgező, és hatása az embriogenezis korai, meglehetősen különleges szakaszára korlátozódik. Arra, amelyet a roppant gyors magosztódások jellemeznek (16. ábra).

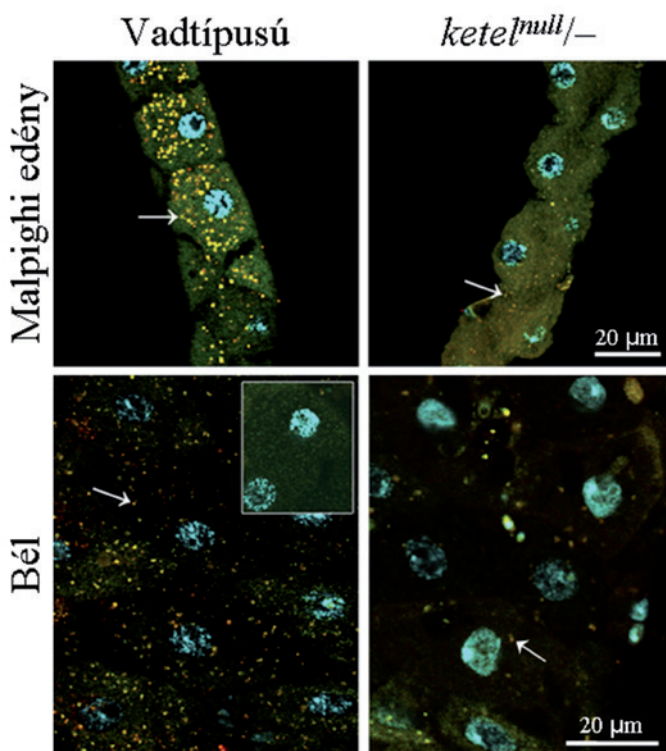
*Miként élhetnek három napot Imp- $\beta$  nélkül a *ketel<sup>null</sup>/-* embriók, lárvák?*

Miután indukáltunk *ketel<sup>null</sup>* mutáns allélokat és deficienciákat is (amelyek eltávolítják az ép *Ketel<sup>+</sup>* gént; Erdélyi et al. 1997), olyan *ketel<sup>null</sup>/-* zigótákat készítettünk, amelyeknek nincs Imp- $\beta$ -t kódoló gényük. Meglepve tapasztaltuk, hogy a zigóták Imp- $\beta$  hiányában három napot élnek: tökéletesen hajtják végre az embriogenezist, továbbá az első és a második lárvastádiumot is. A jelenség azt mutatja, hogy az anyai eredetű Imp- $\beta$ -molekulák hatékonyan teszik dolgukat. Ám miután elbomlanak, és/vagy kihígnak, előbb lelassul, majd véget ér a sejtmagi fehérje import, ami után a *ketel<sup>null</sup>/-* lárvák elpusztulnak.

Azt, hogy az anyai eredetű Imp- $\beta$ -molekulák valóban hosszú életűek úgy mutatuk meg, hogy *ketel<sup>GFP</sup>/+* nőtények utódaiban vizsgáltuk, hogy fejlődésük mely stádiumáig láthatóak az anyai eredetű Imp- $\beta$ -GFP-molekulák (Villányi et al. 2008a). Nos, nem kis meglepetésünkre, az anyai eredetű Imp- $\beta$ -GFP-molekulák egyike-másika még az embriogenezis kezdete utáni hatodik napon, a bábozódó lárvákban is világít a sejtmagpórus komplexekben. A jelenség nem túl meglepő, hisz' ismert, hogy a különféle komplexekben levő fehérjemolekulák védettek a fehérjebontó mechanizmusoktól, ami miatt hosszú életűek lehetnek. Legjobb tudomásunk szerint az Imp- $\beta$  a muslica leg-hosszabb életű fehérjefélesége.

## *Imp-β* és a mitokondriumok képződése

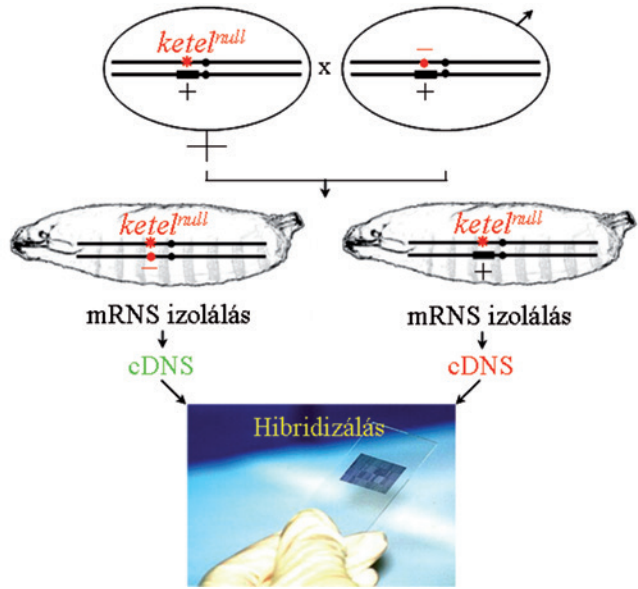
A *ketel<sup>null/-</sup>* lárvákat tanulmányozva azt figyeltük meg, hogy életük végéhez közeledve lelassulnak, miközben a szájszervük koordinátatlanul remeg. Minthogy a koordinátatlan mozgás jelensége mögött a mitokondriumok, az ATP hiányát és/vagy csökkent funkcióját sejtettük, megvizsgáltuk eme jeles sejtszervecskék állapotát a sejtekben. Vad típusú és *ketel<sup>null/-</sup>* lárvákat boncoltunk, és festettük szöveteiket a JC1 jelű festékkel. (A JC1 specifikusan festi a mitokondriumokat: a mitokodriumokban levő JC1-molekulák kék gerjesztő fény hatására 595 nm hosszúságú fluoreszcencia fényt bocsátanak ki. A citoplazmában levő JC1 molekuláktól származó fluoreszcencia fény hullámhossza 535 nm.) A vizsgálat igazolta várakozásunkat: amíg a vad típusú lárváknak bőségesen voltak mitokondriumok, addig a *ketel<sup>null/-</sup>* lárvák sejtjeiben csak néhány mitokondrium „lézengett” (31. ábra; Villányi et al. 2011). Minden bizonnyal azok, amelyek még a pete citoplazmájából származtak. Mitokondriumok és ATP hiányában érthető, hogy a *ketel<sup>null/-</sup>* lárvák lelassulnak, elpusztulnak. Az eredmény az jelzi, hogy az *Imp-β*-nak szerepe van a mitokondriumok képződésében, és érthető, hogy a folyamat *Imp-β* hiányában elma-



**31. ábra. A *ketel<sup>null/-</sup>* lárváknak nem képződnek mitokondriumok.** A képek konfokális mikroszkópban a vörös és a zöld csatornával készült optikai metszetek összevonásával készültek. A nyilak mitokondriumokra mutatnak. A bal alsó kép betéte olyan sejtekről készült, amelyekben a mitokondriumok funkcióját kikapcsoltuk.

rad. Alighanem azért, mert a *ketel<sup>null</sup>/-* lárvákban Imp- $\beta$  hiányában nem történik meg az olyan fehérjék importja a sejtmagba, amelynek szerepe van a mitokondriumok képződésében. Vajon melyek lehetnek azok a fehérjefélek?

A fenti kérdést – hogy ti. mely fehérjefélek importja szükséges a mitokondriumok képződéséhez – a következő módon választottuk meg (Villányi et al. 2011). Első lépésben lelassult, remegő szájszervű *ketel<sup>null</sup>/-*, valamint *ketel<sup>null</sup>/+* (ép, kontroll) lárvákból mRNS-t izoláltunk (32. ábra).



**32. ábra.** Séma annak megállapítására, hogy mely gének kifejeződése változik Imp- $\beta$  hiányában. (Részletes magyarázat a szövegben.)

(Itt *ketel<sup>null</sup>* egy olyan mutáns allélt jelöl, amely nem kódolja funkcióképes Imp- $\beta$ -molekulák képződését, „-” pedig egy olyan deficiencia jele, amely eltávolítja az ép *Ketel<sup>+</sup>* gént.) Az mRNS-molekulák azokat a géneket reprezentálják, amelyek aktívak, kifejeződnek. Az mRNS-ek alapján cDNS-eket szintetizáltunk. Úgy, hogy közben a cDNS-eket zölden, illetve vörösén fluoreszkáló festékekkel jelöltük meg. (A fluoreszcenciát kék fényel gerjesztjük.) A következő lépésben olyan DNS-csipre hibridizáltuk a megjelölt cDNS-molekulákkal, amely a muslica jószerivel minden génjének DNS-ét hordozta, rendezett mintázatban, apró kis foltok sokaságában. Ha valamely gén a *ketel<sup>null</sup>/-* és *ketel<sup>null</sup>/+* kontroll lárvákban egyaránt, és egyforma intenzitással fejeződik ki, a gént reprezentáló cDNS-ek egyforma intenzitással kapcsolódnak (szakszóval: hibridizálnak) a csipen levő komplementer DNS-szálakkal, amely foltocskák aztán sárgán fluoreszkálnak. Ha valamely gén a *ketel<sup>null</sup>/-* lárvákban nem expresszálódik, ám a kontrollban igen, a DNS-csip egyik-másik foltja vörösén fluoreszkál. Ha egy másik gén a *ketel<sup>null</sup>/-* lárvákban kifejeződik, ám a *ketel<sup>null</sup>/+* kontroll lárvákban nem, a gént reprezentáló foltocskák zölden fog fluoreszkálni (32. ábra). Lényegében tehát a DNS-csip fluoreszcencia mintázata alapján meg lehet határozni, hogy Imp- $\beta$  hiányában mely gének kifejeződési mintázata változik, mely géneknek lehet szerepe a mitokondriumok képződésében.

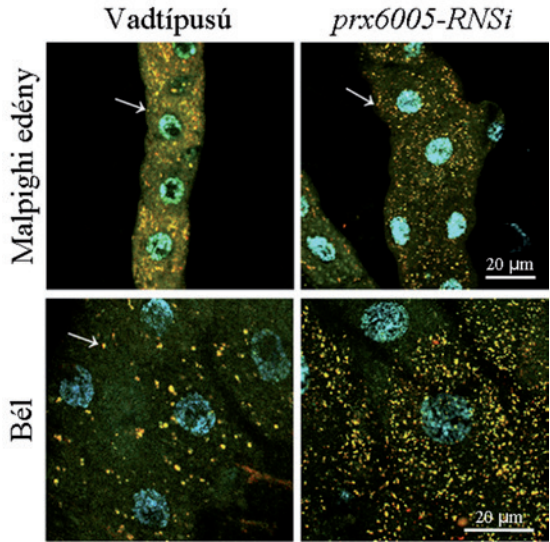
A fenti kísérletből az derült ki, hogy a megvizsgált 10 500 gén közül mindössze 30 kifejeződése változik Imp- $\beta$  hiányában: 7 kifejeződése csökkent (megszűnt), 23-é fokozódott (Villányi et al. 2011). Közülük a *peroxiredoxin-6005* (*prx6005*) szerepe vehető bizonyosra a mitokondriumok képződésében: azokban a lárvákban, amelyekből elimináltuk a *prx6005* gén funkcióját a mitokondriumok sejtenkénti száma mintegy a duplája volt annak, mint amit a kontroll lárvák sejteiben számoltunk (33. ábra; Villányi et al. 2011). A peroxiredoxin

fehérjecsald tagjai egyrészt a  $H_2O_2$  káros hatása ellen védik a sejteket, másrészt szerepet játszanak abban a folyamatban, amely sejtekben az oxidációs-redukciós folyamatok egyensúlyát biztosítja. (A  $H_2O_2$  az  $O_2$  alapú légzés hozadéka.) A *peroxiredoxin-6005* gén terméke tagja annak a jeltovábbító rendszernek, amelynek szerepe van a mitokondriumok képződésében (Villányi et al. 2011).

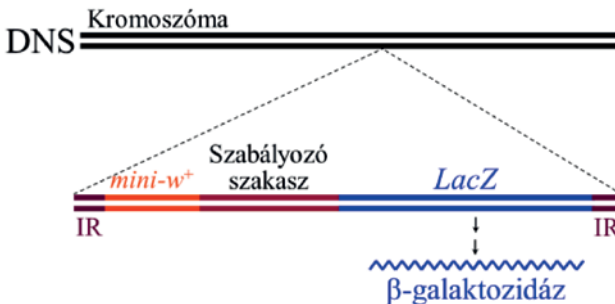
*Miként szabályozott a Ketel<sup>+</sup> gén kifejeződése?*

A fent említett harminc gén között vannak olyan transzkripció faktorok is, amelyek Imp- $\beta$  révén importálódnak a sejtmagba, ahol a DNS-hez kapcsolódva géneket kapcsolnak be, vagy ki, köztük a *peroxiredoxin-6005* gént is.

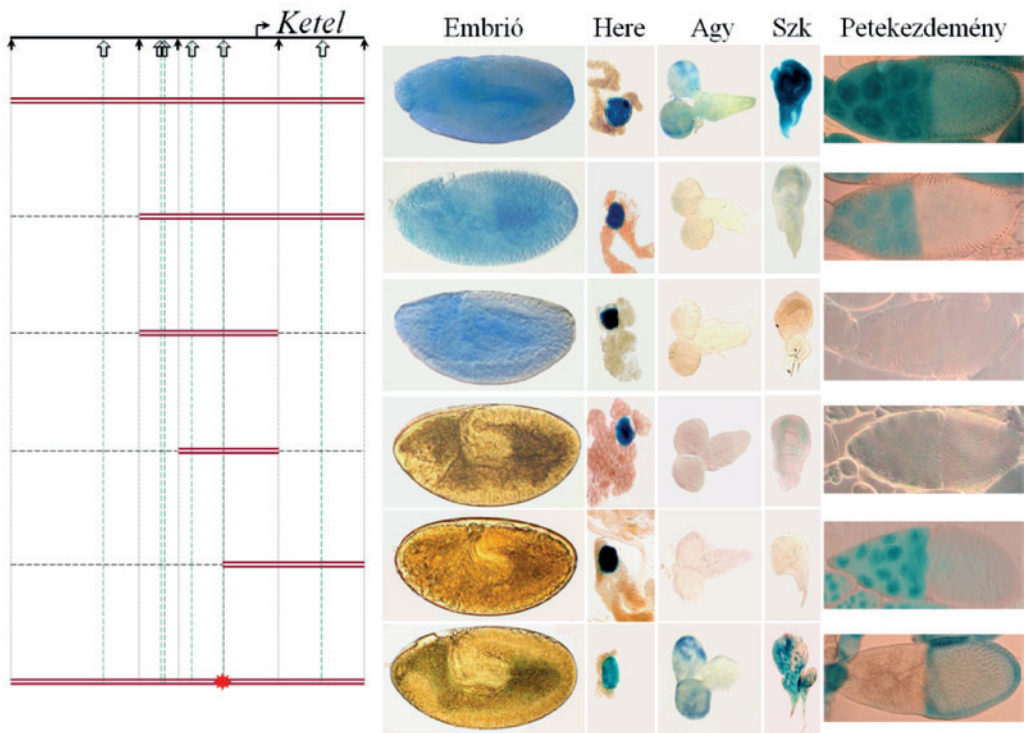
Vajon milyen transzkripció faktorok, és hogyan szabályozzák a *Ketel<sup>+</sup>* gén kifejeződését? A kérdést megválaszolando olyan ún. riporter transzgéneket készítettünk, amelyek a *Ketel<sup>+</sup>* gén promóterét, vagy annak egy részét hordozták, valamint az *E. coli LacZ* génjét (34. ábra; Villányi et al. 2008b). A riporter transzgeenekben a *LacZ* gén kifejeződését a *Ketel<sup>+</sup>* gén promótere, vagy annak csonkolt változatai szabályozták. A *LacZ* gén kifejeződését annak terméke, a  $\beta$ -galaktozidáz enzim aktivitása, illetve az általa katalizált reakcióban képződő kék csapadék alapján követtük nyomon (35. ábra; Villányi et al. 2008b).



33. ábra. A *peroxiredoxin-6005* gén funkciójának hiányában sejtenként mintegy kétszer annyi mitokondrium képződik, mint a kontroll lárvák sejtjeiben. A képek a 31. ábrán bemutatottak szerint készültek. Az RNSi-vel (RNS-interferencia) kioltható a gén aktivitása.



34. ábra. Egy riporter transzgén „szerkezete”. Az *E. coli* baktérium *LacZ* génjének kifejeződését a muslica *Ketel<sup>+</sup>* génjének promótere szabályozza. A *LacZ*-kódolt  $\beta$ -galaktozidáz olyan kémiai reakciót katalizál, amely terméke kék csapadék. (Lásd a 35. ábrát.) A *mini-w<sup>+</sup>* ún. marker szekvencia alapján ismerhetjük fel a transzgént hordozó muslicákat: az ő szemük narancssárga, a transzgént nem hordozóké fehér. Az IR (Inverted Repeat) szekvenciát a muslica egyik mobilis genetikai elemétől vettük kölcsön. Ahhoz szükséges, hogy a riporter gén valamelyik kromoszóma DNS-ébe ékelődjön, a DNS részévé válva öröklődjön generációról, generációra.



**35. ábra. A *Ketel*<sup>+</sup> gén kifejeződését szabályozó szekvenciák azonosítása.** A riportergén-sorozatban a *LacZ* gén kifejeződését a teljes promóter (lila kettős vonal, felül), annak csonkolt részei szabályozták, illetve egy olyan promóter (alul), amelyben egyetlen pontmutációval (\*) három transzkripció faktor kötőhelyét szüntettük meg (Villányi et al. 2008b). A *LacZ* kifejeződési helyein β-galaktoszidáz képződik, amely szintelen szubsztrátból kék csapadékot készít. A nyilak (↑) ún. restriktációs helyeket, illetve különféle transzkripció faktorok kötőhelyeit (⇑) jelölik. A *Ketel*<sup>+</sup> gén transzkripciója a ⇑ helyen kezdődik. A here itt lárvális herét, az szk szárnykezdeményt jelöl.

A riportergén-sorozattal megerősítettük egy korábbi eredményünket, hogy ti. a *Ketel*<sup>+</sup> gén minden sejtben kifejeződik (Lippai et al. 2000). A csonkolt promóterekkel meg tudtuk határozni, hogy a *Ketel*<sup>+</sup> gén promóterében hol vannak azok a szekvenciák, amelyekhez transzkripció faktorok kötődnek, és a gén szövetspecifikus kifejeződését biztosítják (35. ábra). Eredményeinket bioinformatikai és molekuláris biológiai módszerekkel is megerősítettük (Villányi et al. 2008b). Lenyűgözött bennünket: milyen megoldások léteznek arra, hogy egy gén különféle sejt típusokban fejeződjön ki, vagy „maradjon csendben”, terméke megfelelő koncentrációban legyen jelen a sejt életének megfelelő szakaszában.

#### A *Ketel*-csapat

A *Ketel*<sup>+</sup> gén molekuláris szintű vizsgálatába az 1990-es évek elején az MTA Szegedi Biológiai Központjának Genetikai Intézetében kezdtünk Erdélyi Miklóssal és Mihály Józival (7. ábra). Munkánk során hathatós segítséget kaptunk hazai és külföldi kutatóktól is.



A Ketel-program 1993-tól a Szegedi Tudományegyetem Orvosi Biológiai Intézetében folytatódott. A Ketel-kutatások eredményeként műhelyünk négy fiatal munkatársa érdemelte ki a Ph.D. fokozatot: Lippai Mónika, Tirián Laci, Timinszky Gyula és Villányi Zoli (36. ábra). Ma mind a négyen sikeres kutatók, egyetemi oktatók.



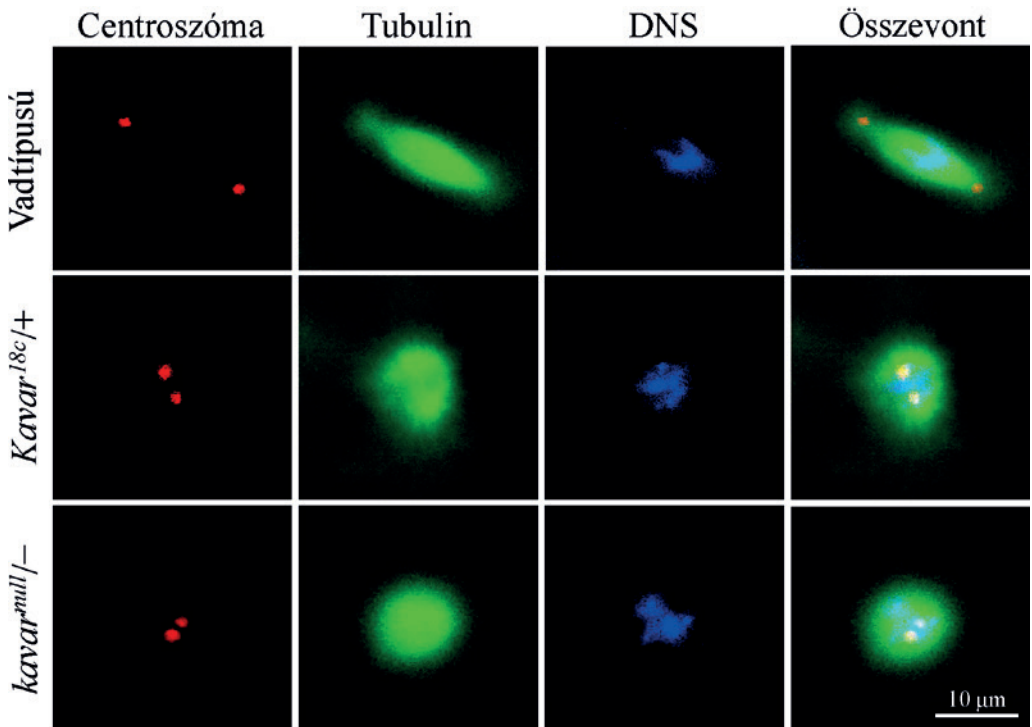
36. ábra. Egykori doktorandusz hallgatók, akik a Ketel-kutatások eredményeként érdemelték ki a PhD-fokozatot.

## A Kavar történet

Abban a mutagenézis sorozatban, amelyben a harmadik kromoszómához kapcsolatos öröklődő *Fs(3)* mutációkat indukáltunk, három *Tomaj<sup>D</sup>*, két *Kavar<sup>D</sup>* és két *Damasa<sup>D</sup>* mutáció bukkant fel (Szabad et al. 1989). Ma már tudjuk, hogy ez a hét *Fs(3)* mutáció azt az *aTub67C* gént azonosítja, amely  $\alpha$ 4-tubulin képződést kódol, az  $\alpha$ -tubulinok ún. anyai hatású változatát (Matthews et al. 1993, Máthé et al. 1998, Venkei et al. 2005). Az 1980-as évek közepe táján azonban úgy tűnt, hogy a hét *Fs(3)* mutáció három gént azonosít: a mutáns fenotípusok meglehetősen különböztek, a térképezés és a komplementációs analízisek eredményei is furcsák voltak. Melléfgotunk. Az ilyesmi bizony meg-megesik, ha az ember olyan területre téved, ahol előtte még senki sem járt. A mutáns allélok eltérő viselkedésére részben az a magyarázat, hogy a mutációk az *aTub67C* gén különféle pontjain következtek be, részben pedig az, hogy a mutáns  $\alpha$ 4-tubulin-molekulák nem egyedül, hanem társakkal kapcsolódva képeznek mikrotubulusokat. De ne szaladjunk a dolgok elé. A Kavar történetet a két legjobban jellemzett allél – *Kavar<sup>18c</sup>* és *Kavar<sup>21g</sup>* – tükrében mutatom be.

### *Kavar<sup>18c</sup> és a mikrotubulus bojtok*

A *Kavar<sup>18c/+</sup>* nőtények petéi megtermékenyülnek és bár a centroszóma osztódik, a leánycentroszómák csak alig különülnek el (37. ábra). Miközben a leánycentroszómák egy kicsiny mikrotubulus bojtot képeznek, véget ér az embriogenezis (Venkei and Szabad 2005). A jelenség emlékeztet arra, amit a *Kete<sup>1D/+</sup>* nőtények petéiben láttunk (18. ábra), és arra ösztökélte csapatunkat, hogy ismerjük meg a *Kavar<sup>18c</sup>*-vel azonosított ép gén molekuláris funkcióját.

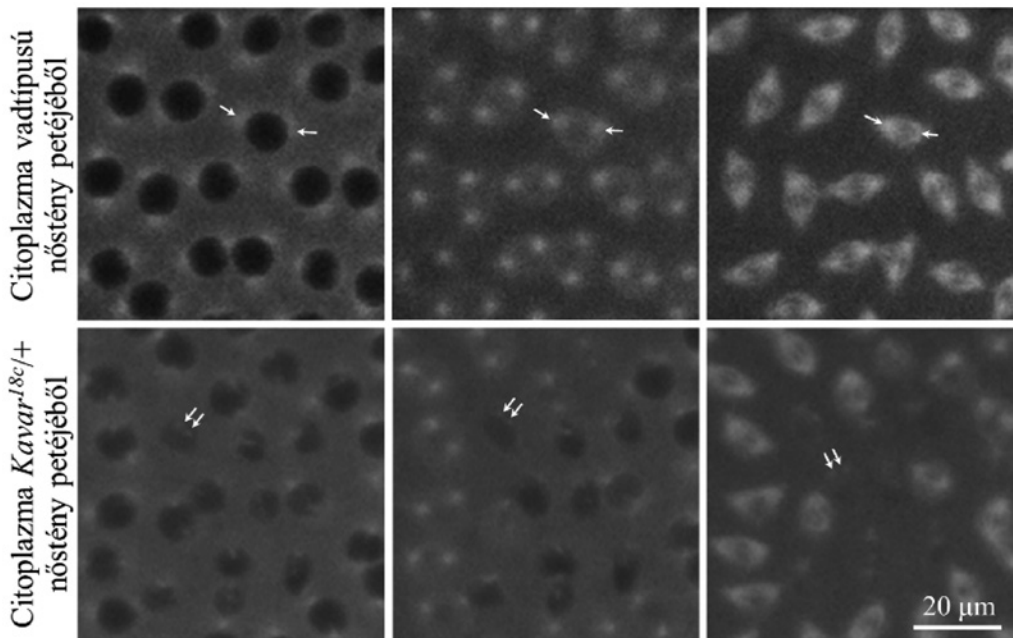


**37. ábra.** *Kavar<sup>18c</sup>/+* és a *kavar<sup>null</sup>/-* nőtények petéiben nem különülnek el a leánycentroszómák, és miközben kis mikrotubulus bojtok képződnek, véget ér az embriogenezis. Itt *kavar<sup>null</sup>* egy funkcióját veszített mutáns allél, – egy olyan kis deficiencia jele, amely eltávolítja az ép (+) gént.

*Kavar<sup>18c</sup>* funkciónyeréses természetét citoplazma injekcióval bizonyítottuk. Abban a kísérletben, amelyben vad típusú pete citoplazmát injektáltunk olyan embriókba, amelyekben a mikrotubulusokat GFP-vel világítottuk ki, a leánycentroszómák elkülönültek, és ép magorsók képződtek (38. ábra). Ellenben a *Kavar<sup>18c</sup>/+* nőtények petéiből származó citoplazma megakadályozta a leánycentroszómák elkülönülését, magorsók képződését, jelezve, hogy a *Kavar<sup>18c</sup>*-kódolt termék toxikus (38. ábra; Venkei et al. 2006). Két kérdés merült fel: vajon domináns negatív természetű-e a *Kavar<sup>18c</sup>*, és melyik gént azonosítja?

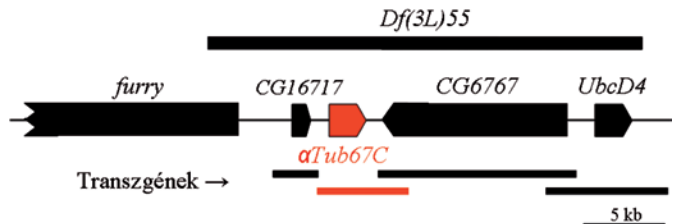
#### *Kavar<sup>18c</sup>* az *aTub67C* gént azonosítja

Minthogy a *Kavar<sup>18c</sup>*-t a harmadik kromoszóma bal karjára térképeztük (Erdélyi and Szabad 1989), olyan *Kavar<sup>18c</sup>/+* nőtényeket készítettünk, amelyek a harmadik kromoszóma egy-egy szakaszát duplikáció formájában is hordozták (Venkei and Szabad 2005). Az olyan *Kavar<sup>18c</sup>/+/+* nőtények petéiben, amelyek a citológiai térkép 67. szakaszát hordozták két kópiában, a bojtos állapotnál sokkal tovább haladt az embriogenezis. És bár a sok ezernyi pete egyikéből sem kelt ki lárva, a megfigyelés azt jelezte, hogy *Kavar<sup>18c</sup>* domináns negatív természetű, és hogy a citológia térkép 67. szakaszában van (Venkei and Szabad 2005).



**38. ábra.** A *Kavarr<sup>18c/+</sup>* nőtények petéiből származó citoplazma injekciója megakadályozza a leánycentroszómák elkülönülését, magorsók képződését. A kísérletben vadtípusú, valamint *Kavarr<sup>18c/+</sup>* nőtények petéiből származó citoplazmát injektáltunk olyan embriókba, amelyekben a mikrotubulusokat GFP világította ki. A nyilak a centroszómákat mutatják.

A következő lépés az volt, hogy a korábban izolált *kavarr* funkcióvesztéses (revertáns, recesszív) allélok olyan deficienciákkal kombináltuk, amelyek a 67. citológiai régió különböző szakaszait ejtik ki. A *kavarr*<sup>-</sup> kombinációk világosan megmutatták, hogy a *kavarr* mutáns allélok a muslica



**39. ábra.** A genom pirosan jelölt szakaszát tartalmazó transzgénnek része az *aTub67C* gén, amelyet a *Kavarr* és a *kavarr* mutációk azonosítanak. A *Df(3L)55* jelű deficiencia a genom 30 kilobázisnyi szakaszát távolítja el. A szakaszban négy gén van, egyikük az *aTub67C*.

genom egy 30 kilobázisnyi szakaszában vannak (39. ábra): a *kavarr*<sup>-</sup> nőtények petéiben lényegében ugyanúgy nem különülnek el a leánycentroszómák, mint a *Kavarr<sup>18c/+</sup>* nőtények petéiben, és ugyanolyan kis mikrotubulus pamacsok képződnek (37. ábra). A kis deficiencia területére négy gén esik (39. ábra). A genom egy-egy szakaszát felhasználva előbb olyan transzgéneket készítettünk, amelyek a négy gén valamelyikét tartalmazták, majd olyan *Kavarr<sup>18c/+</sup>* és *kavarr*<sup>-</sup> muslicákat is, amelyek a transzgénnek valamelyikét hordozták. Két fontos eredmény született. 1. Azoknak a *Kavarr<sup>18c/+</sup>* muslica nőtényeknek a petéiben, amelyek az *aTub67C* transzgént hordozták, a bojtos állapotot messze meghaladó stádiumig fejlődtek az embriók. 2. Azok a *kavarr*<sup>-</sup> nőtények fertili-

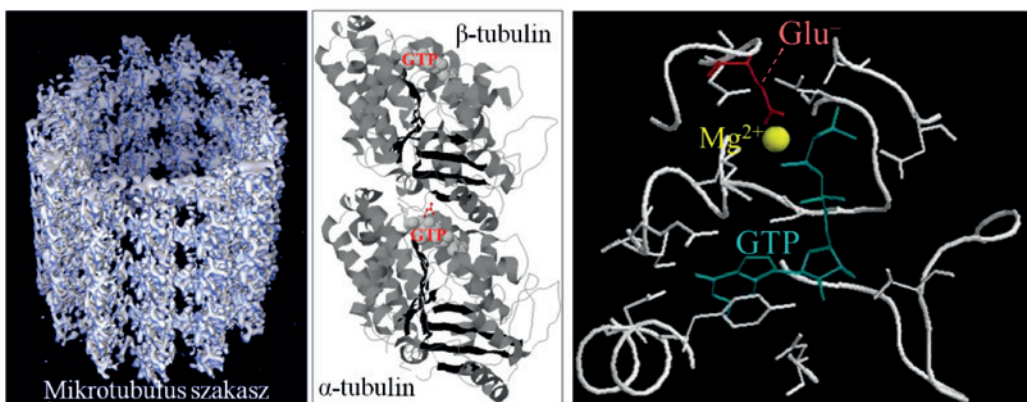
sek, amelyek az *aTub67C* transzgént hordozták (Venkei et al. 2005). (A másik három gén bármelyikéből készített transzgének hatástalanok voltak.) A transzgénekkal folytatott kísérletek világosan megmutatták, hogy a *Kavar<sup>18c</sup>* az *aTub67C* gént azonosítja.

Az eredmény meglepett bennünket, hisz' az *aTub67C* génnel korábban már találkoztunk: a *Tomaj<sup>D</sup>* mutációk is ebben a génben következtek be (Máthé et al. 1998). Ezek után komplementációs analízist végeztünk a *kavar<sup>r</sup>*, a *tomaj<sup>r</sup>* és a *damas<sup>r</sup>* revertáns allélokkal. Kiderült, hogy valamennyien az *aTub67C* gént azonosítják (Venkei and Szabad 2005). A kérdés immáron az volt, hogy mi az  $\alpha$ -tubulin szerepe a muslica embriók életében?

### Tubulinok, mikrotubulusok

Az eukariota sejtekben a tubulinok azok a globuláris fehérje molekulaféleségek, amelyekből a mikrotubulusok, kis 24 nm átmérőjű csövecskék képződnek (40. ábra). A mikrotubulusok nemcsak a sejtvázs alkotói, hanem egyúttal olyan pályák is, amelyeken miközben motor molekulák haladnak, terhet szállítanak. Csodálatos tulajdonságuk, hogy gyorsan képesek össze- és szétszerelődni, a sejt pillanatnyi szükséglete szerint: olykor sejtvázként és pályaként funkcionálnak, hogy aztán a sejtosztódás kezdetén belőlük épüljön fel a magorsó.

A mikrotubulusok „téglauskái” olyan tubulin dimerek, amelyekben egy  $\alpha$ -, valamint egy  $\beta$ -tubulin-molekula kapcsolódik (40. ábra). A tubulin molekulák szerkezeti eleme egy-egy GTP, ami ahhoz is szükséges, hogy tubulin dimerek képződjenek, és polimerizálódjanak. A GTP-t közvetlenül, vagy egy  $Mg^{2+}$  ionon át aminosav oldalláncok tartják a helyén (40. ábra). A *Kavar<sup>18c</sup>* mutáció nyomán annak a negatív töltésű glutaminsavnak a helyét pozitív töltésű lizin foglalja el, amelynek a  $Mg^{2+}$ -ionon át a GTP rögzítésében van szerepe. (A *Kavar<sup>18c</sup>* alapja a gén 224. G=C bázispárjának A=T-re történt cseréje, ami



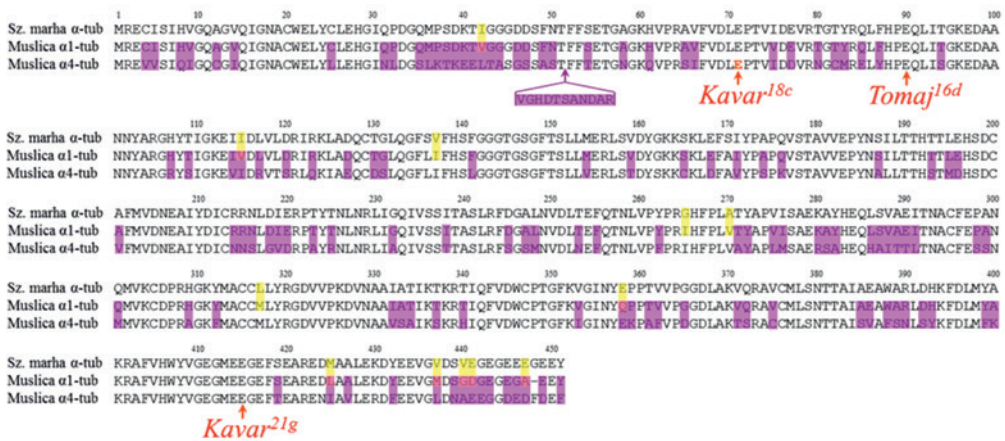
**40. ábra. Mikrotubulus és építő elemei.** Egy  $\alpha$ - és egy  $\beta$ -tubulin-molekula kapcsolódásával képződnek azok a tubulin dimerek, amelyekből a mikrotubulusok felépülnek. Mindkét tubulinféleség szerkezeti eleme a GTP, amely aminosavakkal kapcsolódik, köztük – egy  $Mg^{2+}$ -ionon át – egy glutaminsav ( $Glu^-$ ) oldalláncával. A *Kavar<sup>18c</sup>*-kódolt E82K- $\alpha$ -4-tub molekulákban a  $Glu^-$  helyén pozitív töltésű lizin van, ami nyomán az E82K- $\alpha$ -4-tub molekula instabil, csakúgy, mint az a mikrotubulus, amelybe beépül.

nyomán a 82. aminosav – egy glutaminsav (E) – helyét lizin (K) foglalja el; Venkei and Szabad 2005.) Bár az E82K- $\alpha$ 4-tub molekulák beépülnek a mikrotubulusokba, instabillá teszik azokat. Nem véletlen tehát, hogy a *Kavar*<sup>18c</sup>/+ nőtények petéiben csak rövid mikrotubulusok képződnek (37. ábra).

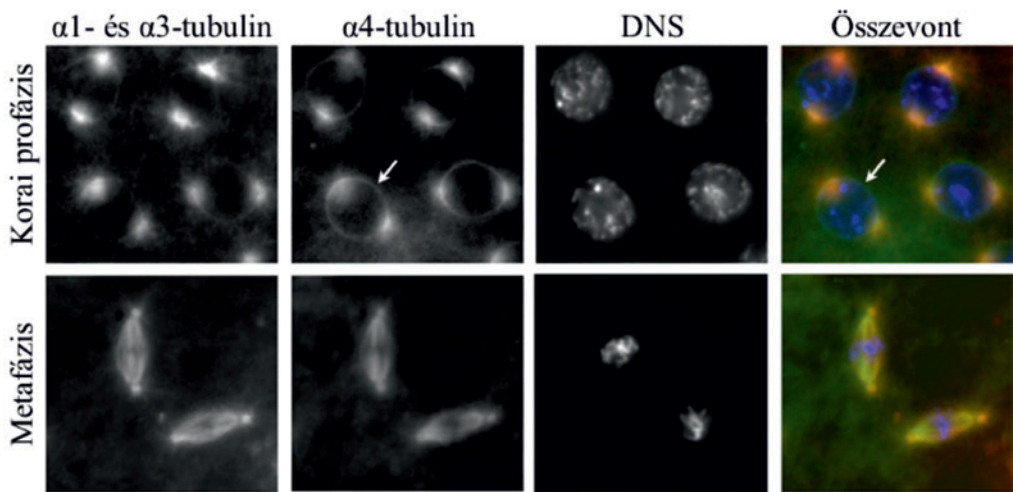
### *$\alpha$ 4-tubulin, az anyai eredetű tubulin féleség*

A tubulinok az evolúció során bevált, aminosav sorrendjükben erősen megőrzött molekulák (41. ábra). Az  $\alpha$ 4-tubulin a muslica négy  $\alpha$ -tubulin féleségének egyike, a korai embriogenezis során használt, ún. anyai eredetű  $\alpha$ -tubulin (Matthews et al. 1993, Venkei and Szabad 2005; Venkei et al. 2006). Az embriogenezis azon szakaszban játszik szerepet, amelyben a sejtmagvak a sejthártyától távol, a citoplazma mélyén vannak, és nyolcpercenként osztódnak (16. ábra). Az  $\alpha$ 4-tubulin a pete citoplazma  $\alpha$ -tubulin készletének 20%-át alkotja, a további 80% az  $\alpha$ 1-, illetve a vele csaknem azonos aminosav-sorrendű  $\alpha$ 3-tubulin, az a két  $\alpha$ -tubulin-féleség, amely mindig, és minden sejtben jelen van. Azt, hogy az  $\alpha$ 4-tubulinra szükség van, az bizonyítja legjobban, hogy hiányában nem kezdődik el az embriogenezis, és csak egy kicsiny mikrotubulus bojt képződik (37. ábra). Kérdés, hogy mi a szerepük az  $\alpha$ 4-tubulin-molekuláknak az embriogenezis korai szakaszában? A kérdést megválaszolandó olyan anti- $\alpha$ 4-tubulin ellenanyagot készítetünk, amellyel (i) az  $\alpha$ 4-tubulin molekulák láthatóvá tehető, és amely ellenanyag (ii) nem ismeri fel a többi tubulin féleséget (Venkei et al. 2006).

Az anti- $\alpha$ 4-tubulin ellenanyaggal folytatott vizsgálatok világosan megmutatták, hogy az  $\alpha$ 4-tubulin, ugyanúgy, mint az  $\alpha$ 1-, illetve az  $\alpha$ 3-tubulin-molekulák, beépül a mikrotubulusokba (42. ábra). Az is nyilvánvaló, hogy az  $\alpha$ 4-tubulin-molekulák előszerezettel épülnek be azokba az ún. interpoláris mikrotubulusokba, amelyek a sejtmaghárya külső felszínéhez tapadnak, és az egyik centroszómától a másikig nyúlnak (Venkei et



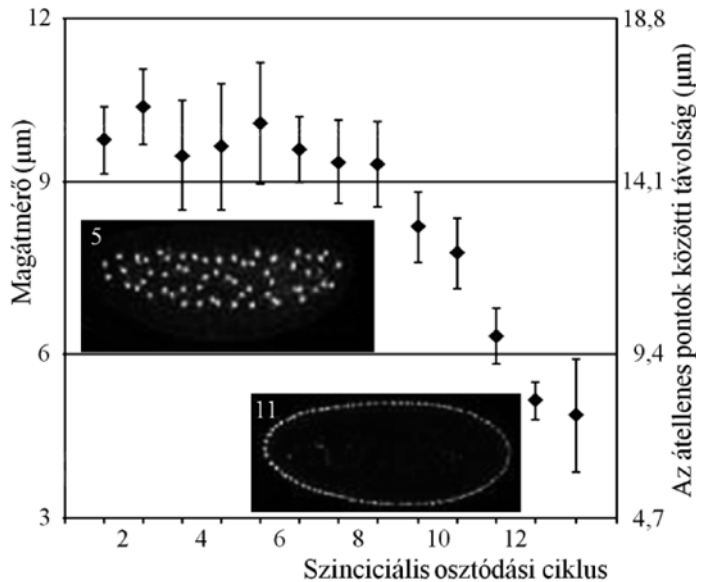
**41. ábra. A szarvasmarha és a muslica két  $\alpha$ -tubulin-féleségének aminosavsorrendje.** A szarvasmarha és a muslica  $\alpha$ 1-tubulinja csak a sárgával jelölt helyeken különbözik. A muslica  $\alpha$ 4-tubulinja a lilával jelölt helyeken tér el az  $\alpha$ 1-tubulintól. Az 52. helyen beékelődött, 11 aminosavból álló blokk szerepe máig ismeretlen. A *Kavar*<sup>18c</sup> E82K-, *Tomaj*<sup>16d</sup> E90K-, *Kavar*<sup>21g</sup> E426K- $\alpha$ 4-tubulin képződését kódolja.



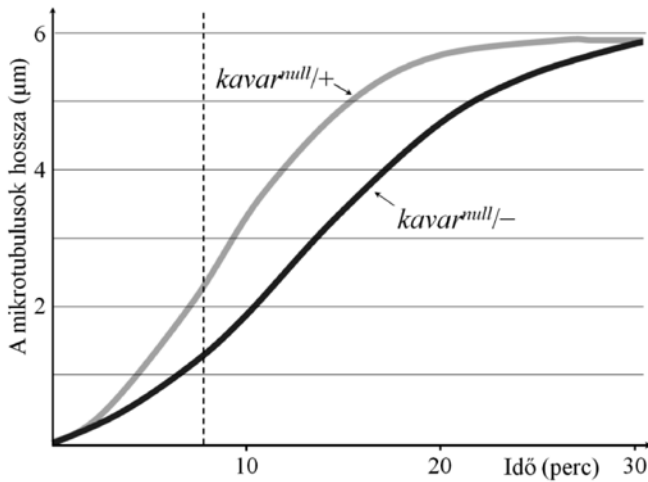
**42. ábra.** Az  $\alpha 1$ - és  $\alpha 3$ -tubulin, valamint az  $\alpha 4$ -tubulin is a mikrotubulusok alkotója. Az  $\alpha 4$ -tubulin előszeretettel van jelen azokban az ún. interpoláris mikrotubulusokban, amelyek a sejtmaghártya mentén futnak centroszómától centroszómáig (↙).

al. 2006). Miközben növekszenek, az interpoláris mikrotubulusok a leánycentroszómákat a sejtmaghártya mentén az ellentétes pólusokba tolják. A megfigyelés azt jelzi, hogy az  $\alpha 4$ -tubulinnak az interpoláris mikrotubulusok életében lehet kitüntetett szerepe. Minden bizonnyal az, hogy kapcsolatban legyenek a sejtmaghártyával. Nem lehet véletlen, hogy a muslica embriogenezis kezdeti szakaszában a magok nagyok, görbületi sugaruk kicsi, és felszínüket anélkül követhetik az egyébként meglehetősen merev mikrotubulusok, hogy eltörnének vagy leválnának a sejtmaghártyáról. Ám amint a magvak a sejthártya közelébe érnek, és azt támpontként használhatják, már nincs szükségük az interpoláris mikrotubulusokra, a sejtmagvak mérete a korábbiak felére, harmadára csökken (43. ábra; Venkei et al. 2006).

Az  $\alpha 4$ -tubulin szerepe azok az *in vitro* kísérleteink derítették fényt, amelyekben a mikrotubulusok növekedését követtük nyomon az

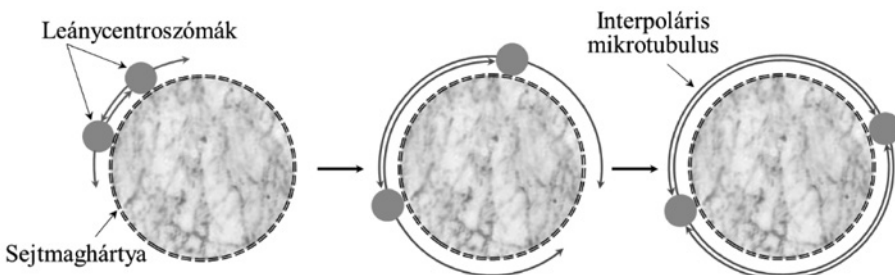


**43. ábra.** A magátmérő változása az osztódási ciklusok során muslica embriókban.

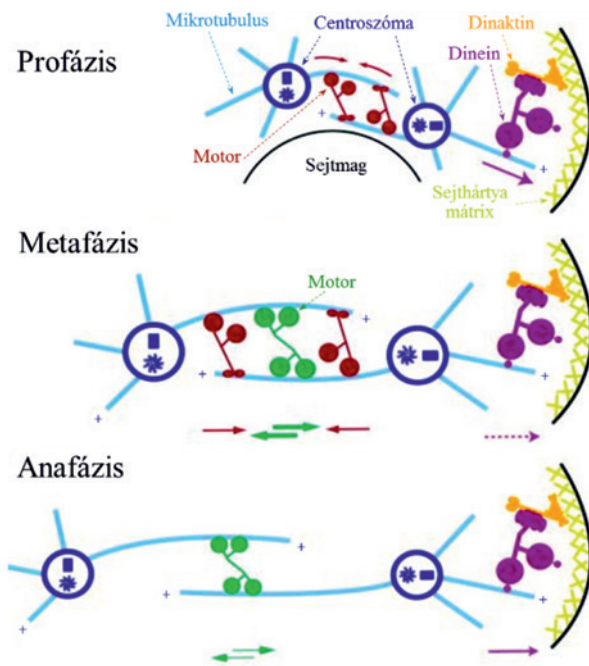


**44. ábra.** Az  $\alpha 4$ -tubulin-molekulák hiányában csak lassan növekszenek a mikrotubulusok. A nyolc perccel jelölő szaggatott vonal egy magosztódási ciklus hosszát mutatja. (Magyarázat a szövegben.)

idő függvényében (44. ábra). A kísérletet menete a következő volt. Citoplazmát izoláltunk vad típusú (+/-), valamint *kavar<sup>n</sup>null/-* nőstények petéiből. A citoplazmához a mikrotubulusok képződését segítő GTP-t adtunk, majd megmértük a képződött mikrotubulusok hosszát. Nem kis meglepetésünkre a mikrotubulusok 30 perc alatt egyforma hosszúra növekedtek (44. ábra). Ám nyolc perc után  $\alpha 4$ -tubulin jelenlétében mintegy kétszer olyan hosszúak voltak a mikrotubulusok, mint  $\alpha 4$ -tubulin nélkül (44. ábra). A megfigyelés azt jelenti, hogy az  $\alpha 4$ -tubulin a mikrotubulusok gyors növekedéséhez szükséges az embriogenezis kezdetén (Venkei et al. 2006). Igyekezetük érthető, hiszen az embrióban egy ciklin/ciklin-dependens-kináz ciklus zakatol, és szabályozza a magosztódásokat. Akkor is, ha a centroszómák a sejtmaghártya mentén már az ellentétes pólusokba juthatnak, és akkor is, ha még nem. A *kavar<sup>n</sup>null/-* nőstények petéiben,  $\alpha 4$ -tubulin molekulák hiányában a mikrotubulusok lassan növekszenek, a centroszómákat csak csekély mértékben tudják eltolni egymástól, ami miatt nem képződnek magorsók,



**45. ábra.** A leánycentroszómákat azok a növekvő interpoláris mikrotubulusok tolják a sejtmaghártya mentén az átelleni pólusokba, amelyek  $\alpha 4$ -tubulin-tartalmuknál fogva gyorsan növekszenek, és a sejtmaghártyához tapadnak.



**46. ábra. A magorsók pozícionálása a muslica pete kérgi részében.** A különféle színek és nyilak más-más motor molekula féleségeket, illetve az általuk a mikrotubulusokra kifejtett erők irányát szimbolizálják. A dineinmolekulákat dinaktinok kötik a sejthártyához, a barna színű motorok a kis körökkel szimbolizált végükkel a mikrotubulusokhoz rögzítettek, a másikkal a mikrotubulusok mentén araszolnak (Sharp et al. 2000 alapján).

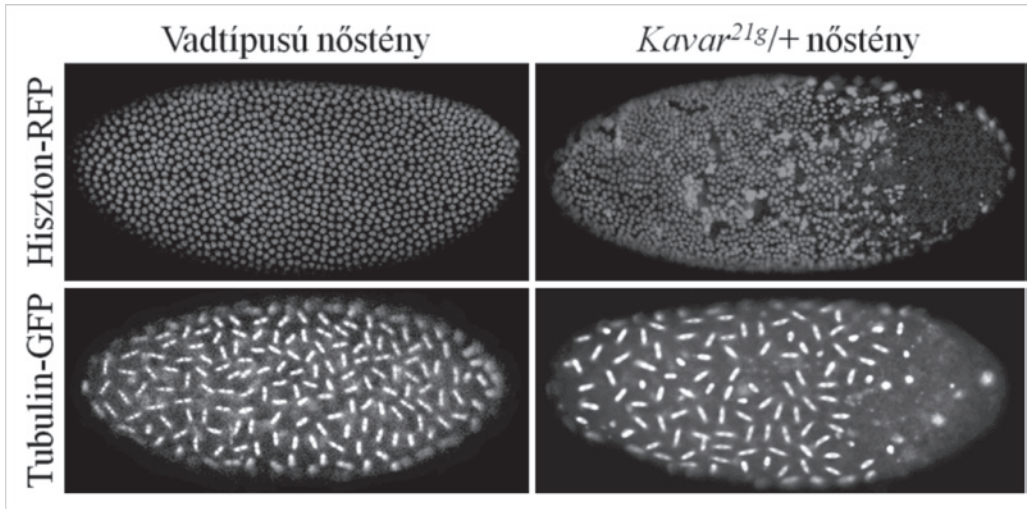
ben. Az  $\alpha 4$ -tubulin-molekulák továbbra is jelen vannak, és részt vesznek pl. a központi idegrendszer kialakításában (Máthé et al. 1998).

### *Kavar<sup>21g</sup> és a késlekedő szállítás*

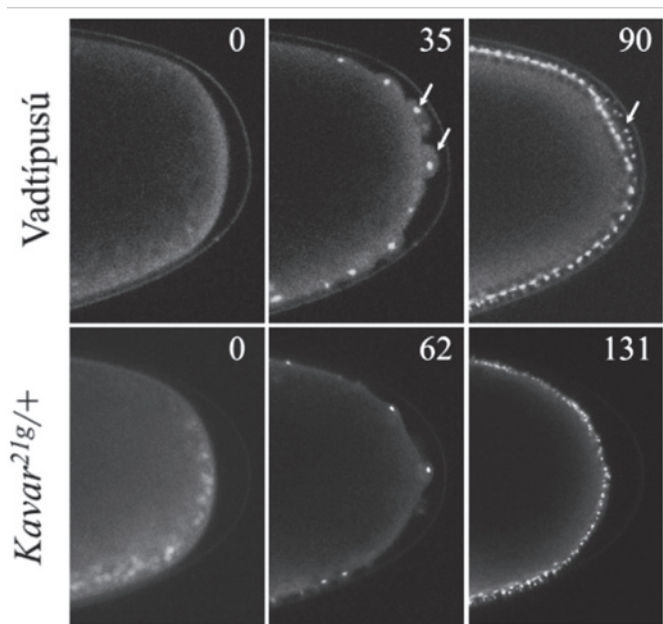
A *Kavar<sup>21g/+</sup>* nőtények embrióiban gyakoriak a kromatin és a mikrotubulus hibák, ami miatt különböző nagyságú foltok maradnak üresen (47. ábra). Érthető, hogy a *Kavar<sup>21g/+</sup>* nőtények embriói elpusztulnak, a nőtények sterilek (Erdélyi and Szabad 1989, Venkei and Szabad 2005). Megfigyeltük, hogy a centroszómák egyike-másika ugyan kijut a pete citoplazma kérgi részébe, ám a megszokottnál sokkal később (48. ábra). A mutáns fenotípus alapján azt feltételeztük, hogy a *Kavar<sup>21g</sup>*-kódolt mutáns  $\alpha 4$ -tubulin molekulák beépülnek a mikrotubulusokba, és mint kis buckák vagy kátyúk akadályozzák a mikrotubulus-motorok haladását, a transzportot (49. ábra). Feltételezésünket fényesen bizonyították a Gáspár Imrével folytatott, lentebb bemutatott kísérleteink (Gáspár and Szabad 2009a and 2009b).

A *Kavar<sup>21g</sup>* allél szekvenálása során kiderült, hogy a mutáció alapja az *aTub67C* gén 1276. helyén levő G=C bázispárjának A=T-re történt cseréje, ami nyomán az

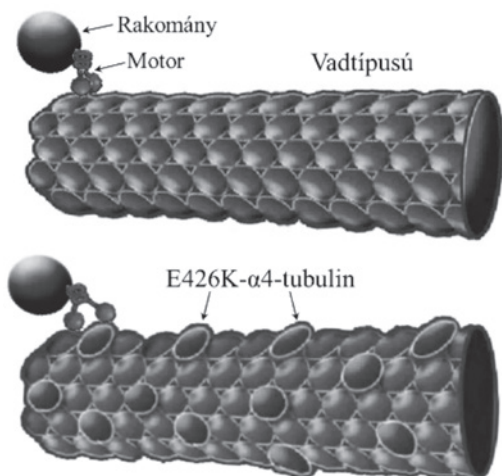




**47. ábra.** A *Kavar<sup>21g/+</sup>* nőstények embrióiban nagy területeket nem népesítenek be az osztódó magvak. Azért maradnak üresen, mert a gyakori kromatin- és mikrotubulus-hibák miatt megsemmisülnek azok a magvak, amelyek utódai a területet benépesíthetnék.



**48. ábra.** Centrosomin-GFP-vel kilágítított centroszómák viselkedése vadtípusú és *Kavar<sup>21g/+</sup>* nőstények embrióiban. (Centrosomin a centroszómákat alkotó fehérjeféleségek egyike; Heuer et al. 1995.) Normális körülmények között a centroszómák a megtermékenyülést követő 35. percben jutnak a pete citoplazma hátulsó kérgi részébe, ahol elkezdődik az ősvarsejtek (✓) képződése. Másfél óra múltán kialakul az ősvarsejtek csoportja, valamint a majdani testi sejtek egyetlen rétege. A *Kavar<sup>21g/+</sup>* nőstények petéinek kérgi részébe, ha egyáltalán érkezik is néhány centroszóma, akkor is csak nagy késéssel, elmulasztva annak lehetőségét, hogy ősvarsejtek képződjenek.



**49. ábra. A *Kavar*<sup>21g</sup>-kódolt E426K- $\alpha$ 4-tubulin molekulák beépülnek mikrotubulusokba, és megnehezítik a motor molekulák haladását.** Minthogy az  $\alpha$ 4-tubulin a pete citoplazma  $\alpha$ -tubulin készletének mintegy 20%-a várható, hogy az E426K- $\alpha$ 4-tubulin molekulák a tubulin heterodimereknek mintegy 10%-ában vannak jelen.

alapján. Megállapítottuk, hogy a minden sejtben jelen levő kinezin motor molekulák – miközben a mikrotubulusok mentén araszolnak, 726 nm/s sebességgel haladnak. Ám nem folyamatosan lépkednek, hanem le-leesnek a mikrotubulusokról. Egy-egy lépéssorozat hossza átlagosan 716 nm, és 1026 ms-ig tart (Gáspár and Szabad 2009a). Miután egy kinezin leesett egy mikrotubulusról, kb. 213 ms-ig vesztegel, ami után felkapcsolódik a közelében levő mikrotubulusok valamelyikére, és halad az előző, vagy azzal ellentétes irányba. Mi mutattuk meg, hogy a kinezin nem folyamatosan lépeget a mikrotubulus mentén, hanem lépésenként kb. 1% annak esélye, hogy a köztük lévő kapcsolat megszakad, a motor leesik pályájáról. Nos, amennyiben a mikrotubulus E426K- $\alpha$ 4-tubulint is tartalmaz, a kinezinmolekulák a megszokottnál sokkal gyakrabban válnak le a mikrotubulusokról, rövidebbek a „lépés-sorozatok”, és persze csökken a transzport sebessége is, ami megmagyarázza a *Kavar*<sup>21g</sup> mutációval kapcsolatos jelenségeket (Gáspár and Szabad 2009b).

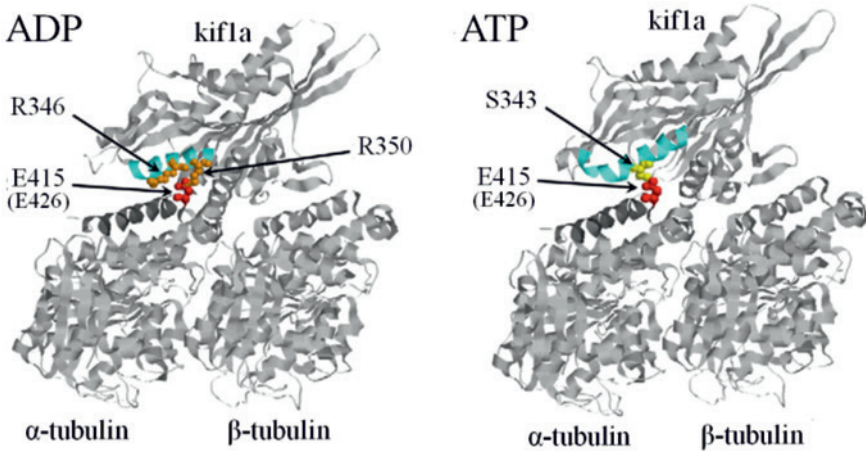
Megfigyeléseink azt mutatják, hogy az  $\alpha$ 4-tubulin 426. helyén levő glutaminsavnak abban van fontos szerepe, hogy lépegetésük során a kinezinek a mikrotubulusokhoz kapcsolódva maradnak. (Zárójelben emlékeztetjük az olvasót: az  $\alpha$ 4-tubulinban az 51. aminosav után egy 11 aminosavból álló blokk van beékelődve. Vagyis a 426. glutaminsav a többi  $\alpha$ -tubulin-féleségben a 415. helynek felel meg; 41. ábra.) Vajon miként köti az  $\alpha$ -tubulinok 415. helyén levő glutaminsav a kinezineket? A 415. glutaminsav (E415) annak a 12.  $\alpha$ -hélixnek a része, amely aminosavsorrendje erősen konzervált (50. ábra). Amikor az ADP-vel kapcsolódó kinezin a mikrotubulushoz kötődik, a negatív töltésű E415 a kinezin két pozitív töltésű argininjének (R346 és R350) szomszédságában van (51. ábra).

$\alpha$ 4-tubulin 426. aminosavának, egy glutaminsavnak (E) a helyén lizin (K) van; E426K- $\alpha$ 4-tubulin molekulák képződnek (Venkei and Szabad 2005). Az E426K- $\alpha$ 4-tubulinnal kapcsolatos jelenségek alapján a mikrotubulusok és a motor molekulák kapcsolatáról tanultunk fontos dolgokat.

Az E426K- $\alpha$ 4-tubulin szerepét úgy vizsgáltuk, hogy lipidcseppecskék útját követtük nyomon muslica petekezdeményekben a konfokális reflexiós mikroszkópia módszerével (Gáspár and Szabad 2009a and 2009b): alkalmas megvilágításban a lipidcseppecskék szórják a fényt, ami a konfokális mikroszkóp egyik csatornájában összegyűjthető. Mindeközben egy másik csatornán a petekezdemény egy másik, kivilágított komponense – pl. a mikrotubulusok – figyelhető meg, sorozatfelvételek

		A tizenkettedik $\alpha$ -hélix				
Ember $\alpha$ 1-tubulin	401	410	420	430	440	450
		-----				
		KRAFVHWYVGE <b>GMEEGEF</b> SEAREDMA <b>ALEKDY</b> EEVGVDSVEGEGE <b>EEGE</b> EY				
Drosophila $\alpha$ 1-tubulin						
		KRAFVHWYVGE <b>GMEEGEF</b> SEAREDLA <b>ALEKDY</b> EEVGVDSGDGEGE <b>GA</b> -EEY				
Drosophila $\alpha$ 4-tubulin						
		KRAFVHWYVGE <b>GMEEGEF</b> TEARENIA <b>LEKDF</b> EEVGLD <b>NAE</b> EGG <b>DE</b> DFDE <b>F</b>				
	412	420	430	440	450	460
		<i>Kavar</i> <sup>21g</sup>				

**50. ábra. Az  $\alpha$ -tubulinok 12.  $\alpha$ -hélice erősen konzervált.** A többi  $\alpha$ -tubulintól kissé különböző  $\alpha$ 4-tubulin 12.  $\alpha$ -hélice a többi  $\alpha$ -tubulinnal 88% azonosságot, és 100% homológiát mutat. A *Kavar*<sup>21g</sup>-kódolt mutáns E426K- $\alpha$ 4-tubulin molekulákban a negatív töltésű glutaminsav (E) helyén pozitív töltésű lizin (K) van.



**51. ábra. Modell a 415. glutaminsav szerepéről.** (Részletes magyarázat a szövegben.)

Az E415, valamint az R346 vagy az R350 közötti ionos kötés köti – meglehetősen gyengén – a kinezin a mikrotubulushoz. Amennyiben az E415 helyén pozitív töltésű lizin (K) van, megszűnik a kinezin kötése, és leválik a mikrotubulusról. Úgy tűnik, hogy az E415-nek akkor is szerepe van a mikrotubulus-kinezin kölcsönhatásban, amikor a kinezin ATP-vel kapcsolódik: a kinezin 343. helyén levő szerinjével (S343) hidrogénhíd kötést képez (51. ábra; Gáspár and Szabad 2009b).

Az E415 és a kinezinek kölcsönhatásáról mondottak helyességét igazolhatja, hogy kinezincsalád tagjainak aminosavsorrendjében erősen konzervált mind az arginin, mind pedig a szerin aminosavak pozíciója (52. ábra).

Lényegében tehát a *Kavar*<sup>D</sup> és a *kavar*<sup>r</sup> mutációkból kiindulva a mikrotubulusok szerződéséről és funkciójáról, kapcsolódásukról a kinezin motor molekulákkal tudunk meg korábban ismeretlen dolgokat. Munkánkban nemcsak örömmel leltük, hanem hasznunkat is: az  $\alpha$ 4-tubulinnal kapcsolatos kutatásaink eredményeiből született Máthé Endre (1996; 7. ábra), Venkei Zsolt (2006) és Gáspár Imre (2008) PhD-disszertációja.

	Egér kifla	333	PADIN	YDE	TL	STL	RY	AD	RAK	QI	RC	NA	VI	360	
Drosophila	Mindenütt	khc	312	PASF	NE	SE	TK	STL	DF	GR	RA	KT	VK	NV	CV
		kin73	331	PSAD	NY	EE	TL	STL	RY	AD	RA	KR	IV	NH	AV
		klp68d	323	PSNY	NY	NE	TL	STL	RY	AS	RA	KSI	Q	NQ	PI
		klp64d	331	PADS	NY	ME	TI	STL	RY	AS	RA	KNI	Q	NR	MH
		ncd	649	PFQD	CF	QE	SV	KS	LR	FA	AS	VN	SC	KM	TK
		klp61f	335	PGHK	DI	EE	TL	STL	EY	AH	RA	KNI	Q	NK	PE
		klp38b	498	PASI	HA	DE	TL	AT	LR	YA	CK	AR	SI	IV	NR
		klp3a	314	PADY	NA	EA	TL	STL	RY	AD	RA	LQ	I	K	NK
	Mitózisban	cmeta	313	PSIM	--	EES	Q	STL	S	FAT	RA	KK	IR	IK	PQ
		klp67a	325	MSSL	TY	ED	TY	N	TL	KY	AS	RA	KK	IR	TL
		klp6410a	589	PGLS	SCE	HT	L	N	TL	RY	AD	RV	KE	L	V
		nod	299	PHQ	CD	L	SE	TL	STL	RF	GT	SA	KK	LR	LN
		pav	431	PRIE	YD	EN	M	Q	V	M	KA	EM	T	Q	E
		kif3c	350	PTDI	H	Y	DE	TI	STL	RY	AS	RA	KNI	S	NK
		kif19a	331	PESK	HR	DE	T	K	N	TL	VY	AD	RA	NS	I
		Valószínű	cana	302	PSFV	--	EES	S	TI	S	F	GT	CA	KK	IR
klp98a	343		PADC	NY	SE	TL	STL	RY	AN	RA	KNI	I	NK		
klp31e	344		PSDR	DF	M	R	TL	N	TL	KY	AN	RA	RNI		
klp54d	495		PAHY	N	HA	EA	TL	N	TL	RY	AS	RA	KR		

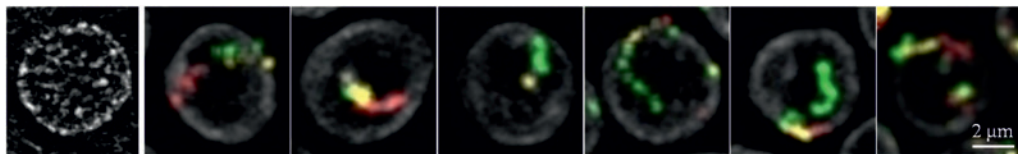
52. ábra. A kinezincsalád tagjaiban módfelett konzerváltak azok az aminosavak, amelyek az  $\alpha$ -tubulinok 415. aminosával (az E415-el) kölcsönhatásba lépnek, és kötik a motor molekulát a mikrotubulusokhoz. A pozitív töltésű argininokat (R) kék, és lizineket (K) kék, a szerineket (S) és a treonint (T) vörös betűk jelölik.

### Bökögető mikrotubulusok és sejtmag-pozicionálás

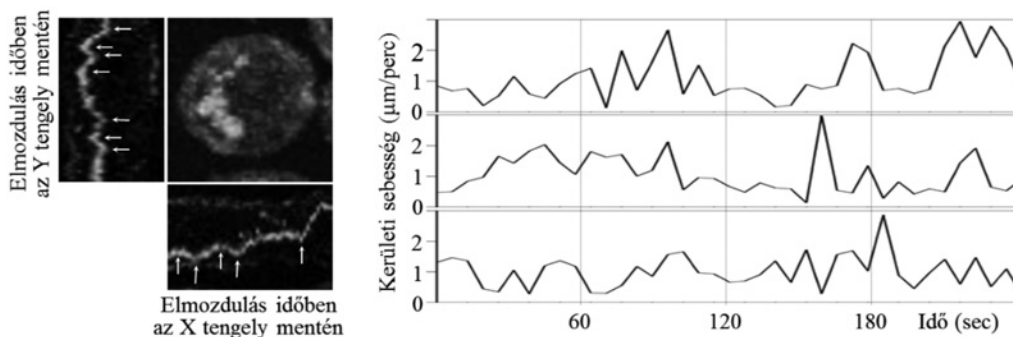
Miközben a lipidcseppek szállítását tanulmányoztuk muslica petekezdeményekben (úgy, hogy optikai metszetekből készült filmcskéket gyorsítva vetítettünk le), arra letünk figyelmesek, hogy a petesejtet burkoló follikuláris sejtek magjai izegnek-mozognak (Szikora et al. 2010 és 2013). Az izgést-mozgást azért vehettük észre, mert a sejtmaghártya pórus komplexeket (NPC) importin- $\beta$ -GFP-molekulák világították ki (53. ábra). Megfigyeltük, hogy az NPC-k egymáshoz viszonyított helyzete hosszú percekken át stabil, és hogy ahány sejtmag, annyi féle az elmozdulásmintázat. A szakirodalmat áttanulmányozva megtudtuk, hogy bár a jelenséget előttünk már öten is leírták (tenyésztet sejtek magjaiban), ám a sejtmagmócorgás mechanizmusa és értelme is ismeretlen volt.

A sejtmagmócorgás részletes vizsgálata megmutatta, hogy a sejtmagvak elfordulásának iránya, szöge és sebessége is változó (54. ábra). Az elfordulás átlagos kerületi sebessége  $1,3 \pm 0,3$   $\mu\text{m}/\text{perc}$ , percenként  $2,9 \pm 0,2$  elfordulás történik, egy elmozdulás  $11,6 \pm 5,8$  fokok, és  $13,8 \pm 3,7$  másodpercig tart.

Vajon csak a sejtmaghártya mocoorg, miközben a sejtmag tartalma egyhelyben áll? Itt nem részletezett vizsgálataink megmutatták, hogy az egész sejtmag mocoorg, sőt vele együtt az endoplazmatikus retikulumnak (ER) a sejtmaghártyával szomszédos



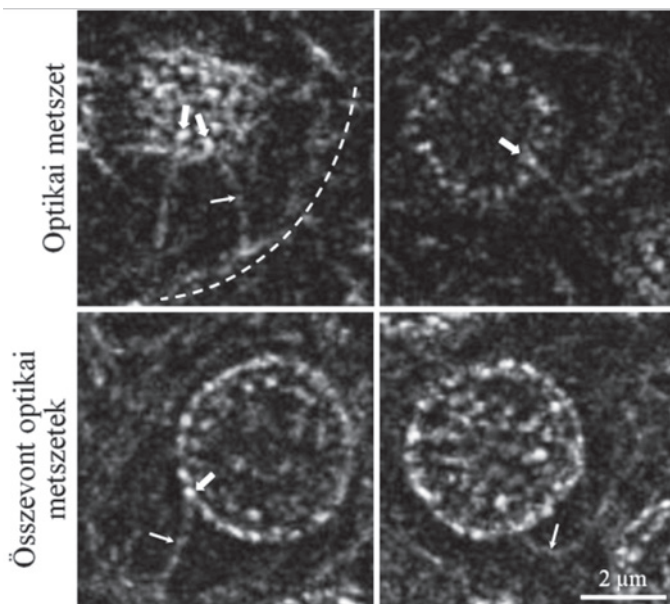
**53. ábra. A sejtmaghártya egy-egy pontja helyének változása hat perc alatt, hat muslica folliculáris sejt magjának esetében.** A baloldali kép egy olyan sejtmagot mutat, amely sejtmaghártya pórus komplexeit importin- $\beta$ -GFP világította ki. A kép hat olyan optikai metszet összevonásával készült, amelyek együtt átérlik a sejtmagot. A hat további kép mindegyike tíz felvétel szuperponálásával készült. A tíz felvétel mindegyike hat, a sejtmagot „átölelő” optikai metszet összevonása nyomán állt össze. A hat felvétel elkészítése 6,4 másodpercet vett igénybe. A kiszemelt NPC vándorlásának kezdeti lépései zölden, a következők sárgán, az utolsók pedig vörösön tűnnek elő.



**54. ábra. A sejtmagmocorgás paraméterei.** Az X, és az Y tengelyre vetített elmozdulások világosan mutatják, hogy a kis elmozdulások hirtelen történnek ( $\leftarrow$  és  $\uparrow$ ). A sejtmagot bemutató kép 81 olyan kép összevonásából készült, amelyek mindegyike hat, a sejtmagot „átölelő” optikai metszetből állt össze. Az ábra jobboldala a kerületi sebesség változását mutatja három sejtmag esetében az idő függvényében.

része is. (Köztudott, hogy az ER nem más, mint a sejtmaghártya külső részének betüremkedése a citoplazmába.) Valójában az ER lengéscsillapítóként szerepel a sejtmag mocorgása folyamán (Szikora et al. 2013).

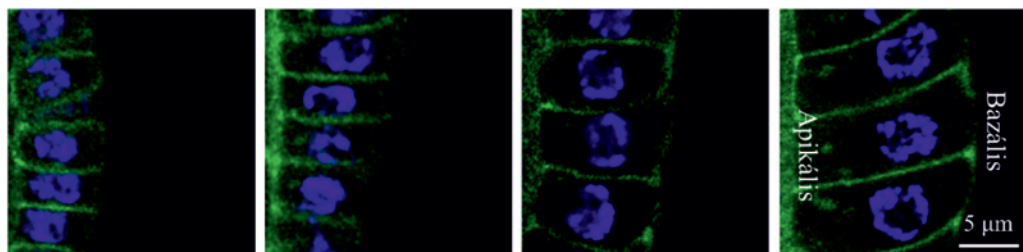
A következő kérdés az volt, hogy mi mozgatja a sejtmagot a folliculáris sejtekben. Itt nem részletezett kísérleteink világosan bizonyították, hogy a növekvő mikrotubulusok felelősek a jelenségért: taxol (ami stabilizálja a mikrotubulusokat) vagy kolhicin (ami hatására lebomlanak a mikrotubulusok) kezelés nyomán megszűnt a sejtmagvak mocorgása (Szikora et al. 2013). Kézenfekvő volt a következő lépés: egyszerre világítsuk ki az NPC-eket és a mikrotubulusokat. Az elgondolás több okból is kiválóan bizonyult. Megláttuk és lefilmeztük, amint a mikrotubulusok a sejtmaghártyába ütköznek, és meggömbülnek. A görbülés biztos jele annak, hogy a mikrotubulusok erőt fejtenek ki a sejtmaghártyára (55. ábra). A felvételek alapján úgy tűnik, hogy a mikrotubulusok az NPC-kkel kapcsolódnak, miközben egy kicsit elfordítják a sejtmagot. A megfigyelés nem véletlen: elsőként mutattuk meg, hogy a mikrotubulusok kapcsolódnak az NPC-eket alkotó nukleoporin fehérjék némelyikével (Tirián et al. 2003). A mikrotubulusok hosszának és rugalmassági állandójuk ismeretében az  $F_c = \pi^2 EI / L^2$  képlet alapján kiszámolható az az erő, amelyet a mikrotubulusok a sejtmaghártyára kifejtenek. (Itt EI az ún. rugal-



**55. ábra. A mikrotubulusok bökögetik a sejtmaghártyát.** Az NPC-eket és a mikrotubulusokat GFP-vel kivilágítva tettük láthatóvá, és filmeztük őket élő muslica petekezdemények follikuláris sejteiben. (A kiboncolt petecsöveket halokarbon olajjal fedtük le kevés tápoldatban. A halokarbon olajban lélegzenek a petekezdemények, nem száradnak ki. Órákon át életben maradnak.) A mikrotubulusok némelyike a sejtmaghártyának ütközik és elgörbül (↓), erőt fejt ki. Úgy tűnik, hogy a mikrotubulusok az NPC-knél feszülnek neki a sejtmaghártyának (⇓). A szaggatott vonal a sejtártya helyét jelöli, azt a helyet, ahonnan mikrotubulusok növekszenek a sejt belseje, a sejtmag felé.

massági tényező, amely értéke a mikrotubulusok esetében – más-más szerzők szerint – 4 és  $40 \times 10^{-24} \text{ Nm}^2$ ,  $L$  a mikrotubulusok hossza, ami 2,5 és 6,5  $\mu\text{m}$  között változik.) Méréseink és számításaink alapján arra derült fény, hogy a növekvő, a sejtmaghártyába ütköző, elgörbülő mikrotubulusok 5-40 pikonewton erőt fejtenek ki a sejtmagvakra. Amikor erőkifejtésük határára érnek hirtelen lebomlanak, abbamarad a sejtmag elfordulása (Szikora et al. 2013). A sejtmag mocorgását lényegében azok a növekvő mikrotubulusok okozzák, amelyek nekiütköznek a sejtagnak, növekedésük közben erőt fejtenek ki, miáltal egy kicsit elfordítják a sejtmagokat. A kérdés immáron az, hogy mi a jelenség értelme?

Miközben azt tanulmányoztuk, hogy miként bökődik a mikrotubulusok a sejtmagot, azt vettük észre, hogy a sejtmagvak a follikuláris sejtek apikális végéből a bazális felszín közelébe jutnak (56. ábra). Mindeközben a nagyjából  $60 \mu\text{m}^3$  térfogatú sejtek  $380 \mu\text{m}^3$ -esre növekszenek, sejtmagjaik 5  $\mu\text{m}$ -t hagynak maguk mögött egyetlen nap alatt (Szikora et al. 2013). Miután elérik rendeltetési helyüket, aktin mikrofilamentumok pályvázák ki őket, a sejtek pedig hamarosan elkezdik a peteburkok készítését. Bár a kipányvázott sejtmagokat a mikrotubulusok tovább bökődik, azok nem mozdulnak. Ha megakadályozzuk az aktin mikrofilamentumok képződését, a sejtmagvak a bazális

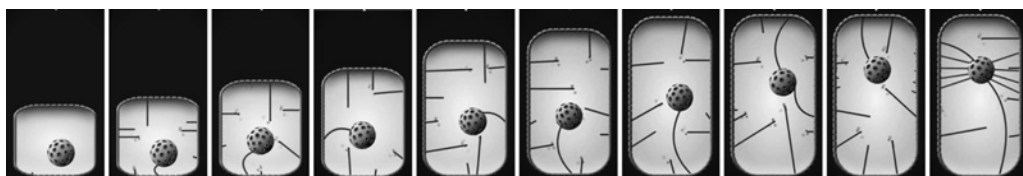


**56. ábra.** A petekezdemények, a folliculáris sejtek növekedése során a sejtmagvak a sejtek apikális végéből a bazális közelébe jutnak.

felszínig sodródni (Szikora et al. 2013). Lehet, hogy a sejtmagvak helyükre bökögetése a folyamat lényege? A kérdést eldöntendő taxollal megakadályoztuk a mikrotubulusok növekedését, azt, hogy bökögessék a sejtmagokat. És valóban, taxol jelenlétében bár növekedtek a folliculáris sejtek, magjaik az eredeti helyükön maradtak. Érthető, hogy taxol jelenlétében a folliculáris sejtek funkciója összezavarodott, a petekezdeményekből nem képződtek peték (Szikora et al. 2013). Vagyis annak célja, hogy a mikrotubulusok a sejtmagokat bökögetik nem más, mint az, hogy a sejtmagvak a megfelelő helyre jussanak. Lényegében a sejtmagvak pozicionálásának egy korábban ismeretlen módját fedeztük fel (Szikora et al. 2013).

Időközben kiderült, hogy a jelenség, hogy ti. a mikrotubulusok „masszírozzák” a sejtmagokat nem szokatlan jelenség. Vannak, akik úgy vélik, hogy szerepe van a kromatin szerveződésében, a génexpresszió szabályozásában (Gerlitz et al. 2013).

Munkánk eredményeként a sejtmagpozicionálás új modelljét alkottuk meg (57. ábra). (A korábban ismert modellekről Szikora et al. 2010 munkája ad áttekintést.) A folliculáris



**57. ábra.** A sejtmag-pozicionálás új modellje. A növekvő folliculáris sejtek magját a mikrotubulusok bökögik a helyükre. Miután rendeltetési helyükre kerültek, aktin mikrofilamentumok rögzítik a sejtmagot (Szikora et al. 2013).

sejtek kérgi részéből növekvő mikrotubulusok miközben a sejtmagot bökögetik, a helyére taszigálják. Az oldalról a sejtbe benövő mikrotubulusok a sejtmagot a sejt középvonalában tartják, az apikális vég felől növekvők a bazális felszín felé, a bazális felszín közeléből növekvők az apikális felé lökögik a sejtmagot. Minthogy az előbbiből 2,3-szor annyi van, mint az utóbbiból, érhető, hogy a sejtmag az apikálisból a bazális felé halad (Szikora et al. 2013).

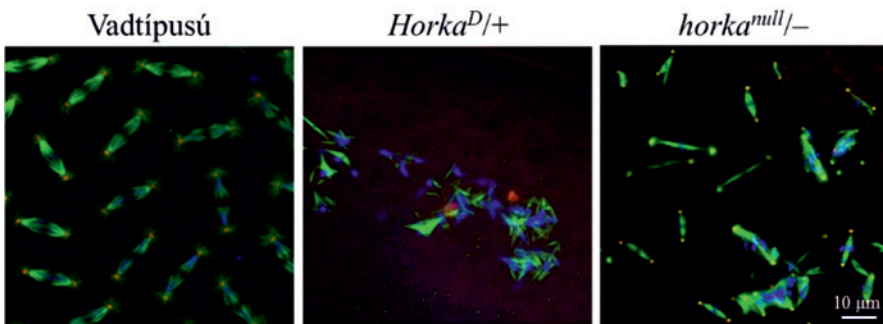
A *Kavar<sup>D</sup>* mutációkból kiindulva a tubulinok, a mikrotubulusok szerveződéséről, funkciójáról tanultunk új és érdekes dolgokat. Munkánk eredményeként született meg Máthé Endre, Venkei Zsolt, Gáspár Imre és Szikora Szilárd és PhD-disszertációja (58. ábra). Ma mind a négyen sikeres kutatók.



58. ábra. Egykori doktorandusz hallgatók, akik a mikrotubulusokkal kapcsolatos kutatások eredményeként érdemelték ki a PhD-fokozatot.

## A Horka/lodestar történet

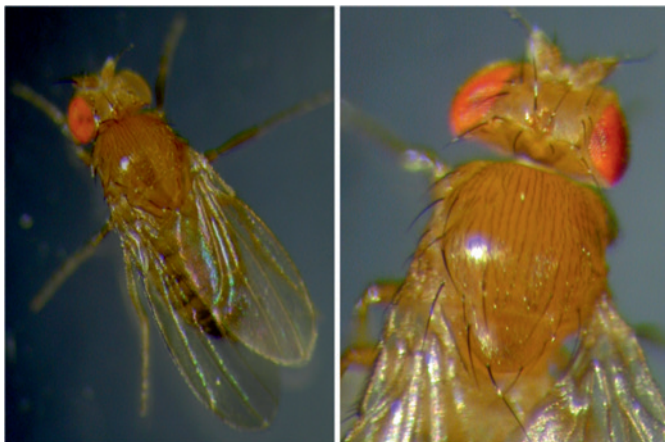
*Fs(3)Horka<sup>D</sup>* (*Horka<sup>D</sup>*) a harmadik kromoszómához kapcsoltn öröklődő domináns nőstény-steril mutációk egyike (Erdélyi and Szabad 1989). A *Horka<sup>D/+</sup>* nőstények embriói roppant korán elpusztulnak. Bennük kromoszómák, mikrotubulusok és két-két leánycentroszóma kavalkádja látszik (59. ábra; Szalontai et al. 2009). Bár a mutáns fenotípus érdekesnek tűnt, elhatározásunkat, hogy ti. megismerjük a *Horka<sup>D</sup>*-vel azonosított ép gén molekuláris funkcióját, a véletlen szülte. Egy alkalommal gyorsan, és sok *Horka<sup>D/+</sup>* nőstényre volt szükségem. Mivel éppen bőven voltak *y v f mal/y v f mal* szűz nőstényeim, *X/Y; Horka<sup>D/+</sup>* hímekkel kereszteztem őket. (Zárójelben három megjegyzés kívánkozik ide. 1. A genetikai háttérből fakadó esetleges bonyodalmakat elkerülendő az *Fs* mutációkat hordozó nőstényeket nem a második táblázatban bemutatott törzsekből gyűjtjük, hanem genetikai keresztezések utódai közül. 2. A *y v f mal* törzset, amelyben az *X* kromoszóma négy recesszív marker-mutációt hordoz, előszeretettel használtuk kísérleteinkben; lásd pl. Wieschaus and Szabad 1979, Szabad et al. 1979; Cumberledge et al. 1992; Szabad and Nöthiger 1992. A genetikai szimbólumok jelentése a következő: *y* sárga test, *v* rikító piros szemek, *f* villás szőrzet, *mal* barna szem és az aldehid-oxidáz



59. ábra. A *Horka<sup>D/+</sup>* nőstények petéiben kromoszómák, mikrotubulusok és centroszómák összevisszasága látszik. A *horka<sup>null/-</sup>* nőstények petéiben feltűnően abnormalisak a magorsók, és rendellenes a kromoszómák elhelyezkedése. A képeken a DNS kék, a mikrotubulusok zöld, a centroszómák vörös színben látszanak. (Itt „-” egy olyan deficiencia jele, amely eltávolítja az ép gént.)



enzim hiánya. 3. Az X kromoszóma hordozta a négy marker-mutáció vad típusú allélját.) Miközben az utódok közül az  $XX$ ; *Horka<sup>D</sup>/+* nőtényeket gyűjtöttem, alig hittem a szememnek: az  $XX$  utódok több mint 20%-a gynander volt,  $XX//X0$ , nőstény//hím mozaik (60. ábra; 0 az X kromoszóma hiányát jelöli; Szabad et al. 1995). A gynandereket korábbi munkáinkból jól ismertem (Kiss et al. 1996; Szabad et al. 1979; Szabad and Fajsi 1982, Szabad and Nöthiger 1992, Villányi et al. 2008a). Úgy képződtek, hogy az  $X/Y$ ; *Horka<sup>D</sup>/+* hímeiben



**60. ábra. Egy muslica gynander, valamint egy haplo-4 mozaik.** Amíg a gynander ( $XX//X0$ , nőstény//hím mozaik) bal oldala  $XX$  nőstény, és nem mutatja a recesszív marker mutációk fenotípusát, addig a jobb oldala  $X0$  hím, és mutatja a recesszív marker mutációk fenotípusát (*y* sárga kutikula, *w* fehér szem). A gynander  $X0$  oldalán a szárny, a hímekre jellemzően rövid. A haplo-4 mozaik jobb oldalán a szőrök vékonyabbak, és rövidebbek, mint a baloldalon (Szabad et al. 1995).

a spermatogenezis folyamán instabillá vált az X kromoszóma, amely aztán az utód embriók egyik-másik sejtmagjából elveszett. Az X kromoszóma vesztese nyomán képződtek az  $XX//X0$  mozaikok (Szabad et al. 1995). A gynanderek képződése azt mutatja, hogy *Horka<sup>D</sup>* instabillá teszi az X kromoszómát (és mint kiderült – az Y kivételével – a többi is; Szabad et al. 1995). A kromozómainstabilitást az is mutatja, hogy *Horka<sup>D</sup>* a spermatogenezis során nagy gyakorisággal okoz nondiszjunkciót: olyan spermiumok képződését, amelyekben a megszokottnál több vagy kevesebb kromoszóma van (Szabad et al. 1995). A *Horka<sup>D</sup>*-vel kapcsolatos jelenségek azt jelzik, hogy a *Horka<sup>D</sup>*-vel azonosított ép génnek a kromoszómák stabilitásának megőrzésében lehet szerepe, egy olyan folyamatban, amely megértéséhez segíthet az ép gén molekuláris funkciójának megismerése.

### *Horka<sup>D</sup>* a lodestar gént azonosítja

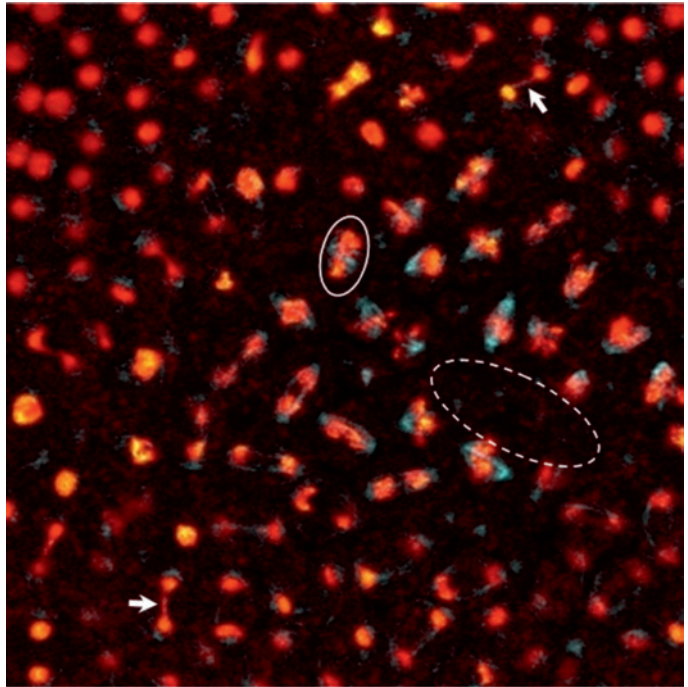
A *Horka<sup>D</sup>*-ből kiindulva akkor ismerhető meg az ép gén molekuláris funkciója, ha *Horka<sup>D</sup>* funkciónyeréses típusú, és domináns negatív természetű (1. táblázat). *Horka<sup>D</sup>* természetét eldöntendő először *Horka<sup>D</sup>/+* nőtények petéjéből származó kevéske citoplazmát injektáltunk olyan embriókba, amelyekben a mikrotubulusok zölden, a kromoszómák vörösen voltak kivilágítva. A citoplazma injekció nyomán abnormális magorsók, kromatinhidak és szabad centroszómák képződtek, az ún. mitotikus katasztrófa jelenségének jól ismert bélyegei (61. ábra; Szalontai et al. 2009). A mitotikus katasztrófa és a kromoszóma/genom stabilitás kapcsolata jól ismert (Vakifahmetoglu et al. 2008, Vitale et al. 2011), és munkánk folytatására ösztökélt bennünket. Azt, hogy *Horka<sup>D</sup>* domináns termé-

szetű-e, a már korábban bemutatott módon döntöttük el: olyan *Horka<sup>D/+</sup>* nőtényeket készítettünk, amelyek a két kromoszómagarnitúra mellett a harmadik kromoszóma jobb karjának egy-egy szakaszát is hordozták. Azoktól a *Horka<sup>D/+</sup>* nőtényektől, amelyek a 84-85. citológiai régió extra kópiáját hordozták, néhány utód származott. Vagyis *Horka<sup>D</sup>* domináns negatív természetű (Szalontai et al. 2009), érdemes belevágni a következő lépésbe, a gén klónozásába.

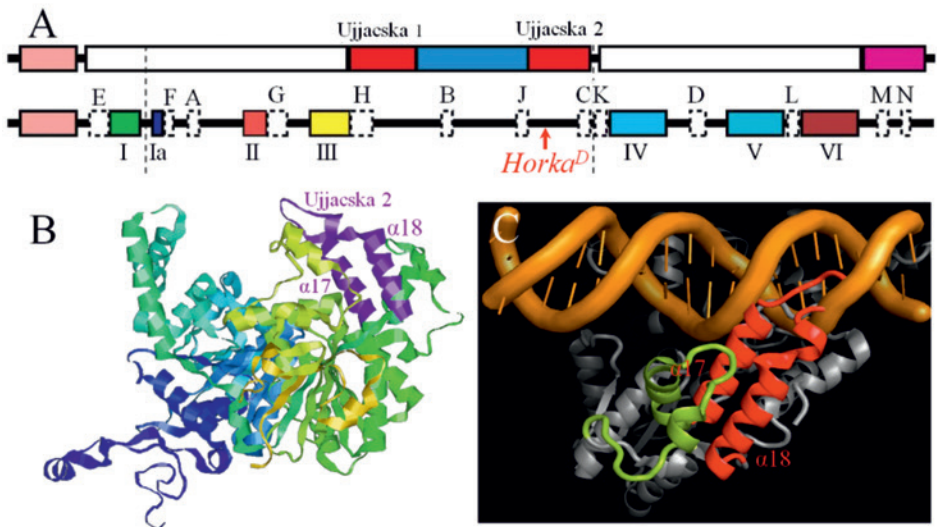
A molekuláris funkciót megismerendő, először *Horka<sup>D</sup>*-ből második mutagenézis során *horka<sup>RP</sup>* revertáns (recesszív, funkcióvesztéses) allélokot

készítettünk. A mutagenézist P-elemmel, a muslica egyik transzpozonjával végeztük (Szalontai et al. 2009). Miután a P-elemmel indukált, ún. *horka<sup>RP</sup>* allélokot olyan deficienciákkal kombináltuk, amelyekből a 84-85. citológiai régió egyes szakaszai hiányoznak, kiderült, hogy a keresett gén a 84E1-84E8 szakaszban van: a *horka<sup>RP/-</sup>* nőtények sterilek, petéikben abnormálisak az osztódások (59. ábra). A következő lépés komplementációs analízis volt: a *horka<sup>RP</sup>* allélokot a 84E1-84E8 szakaszban levő gének mutáns alléljaival kombináltuk. Nos, minthogy a *horka<sup>RP</sup>* allélok nem komplementálja a *lodestar* gén mutáns alléljait, nyilvánvaló, hogy *Horka<sup>D</sup>* és a *horka<sup>RP</sup>* allélok a *lodestar* (*Ids*) gént azonosítják (Szalontai et al. 2009). Azt, hogy *Horka<sup>D</sup>* és a *horka<sup>RP</sup>* allélok valóban az *Ids* gént azonosítják, úgy is bizonyítottuk, hogy olyan *horka<sup>RP/-</sup>* nőtényeket készítettünk, amelyek egy *lodestar<sup>+</sup>* transzgént is hordoztak. Az ilyen nőtények tökéletesen fertilisek (Szalontai et al. 2009).

A *lodestar* génről korábban már megjelent egy dolgozat, amelyben leírták, hogy az *lds/Ids* nőtények sterilek: embrióik elpusztulnak, mert sok bennük az elkallódó kromoszóma (Girdham and Glover 1991). Ám a *lodestar* gén molekuláris funkciója ismeretlen maradt. Az azonban világos volt, hogy a *lodestar* gén a helikáz-szerű népes család egyik tagja (Flaus et al. 2006). A helikáz-szerű fehérjék olyan folyamatok résztvevői, mint a transzkripció szabályozása, a DNS-hibák javítgatása, a rekombináció, vagy a kromatin



**61. ábra. *Horka<sup>D/+</sup>* nőtények petéiből származó citoplazma hatása vadtípusú embriókra.** A citoplazma injekció nyomán abnormális magorsók (egyikük bekarikázva), kromatinhidak (→), és szabad centroszómák (szaggatott vonallal bekerítve) képződnek. Az embriókban a mikrotubulusok zölden, a kromoszómák vörösén voltak kivilágítva.



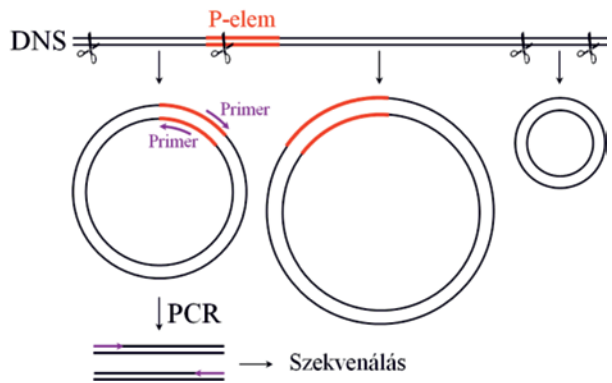
**62. ábra. Helikáz-szerű fehérjék.** A: a helikáz-szerű fehérjékben nukleotid-trifoszfat-kötő (I, Ia, II stb.), valamint jellegzetes, erősen konzervált funkciójú (E, F, A stb.) motívumok vannak. *Horka<sup>D</sup>* a megjelölt helyen bekövetkezett egyetlen bázispár-csere mutáció következménye. B: a Rad54 – egy helikáz-szerű fehérje – térbeli szerkezete. A második ujjacskát a 17. és a 18.  $\alpha$ -hélixek és az őket összekötő szakasz alkotja. C: a második ujjacska a DNS nagy árkába fekszik, és miközben ATP-ből származó energiával motorként halad, fehérje molekulákat „hánt le” a DNS-ről (Thomä et al. 2005).

szerkezetének alakítása. A helikáz-szerű fehérjék szerveződése módfelett hasonló: evolúciósan jól megőrzött nukleotid-trifoszfat-kötő, valamint jellegzetes funkciót betöltő motívumok vannak bennük (62. ábra). A kérdés továbbra is az volt, hogy mi a *lodestar* gén molekuláris funkciója?

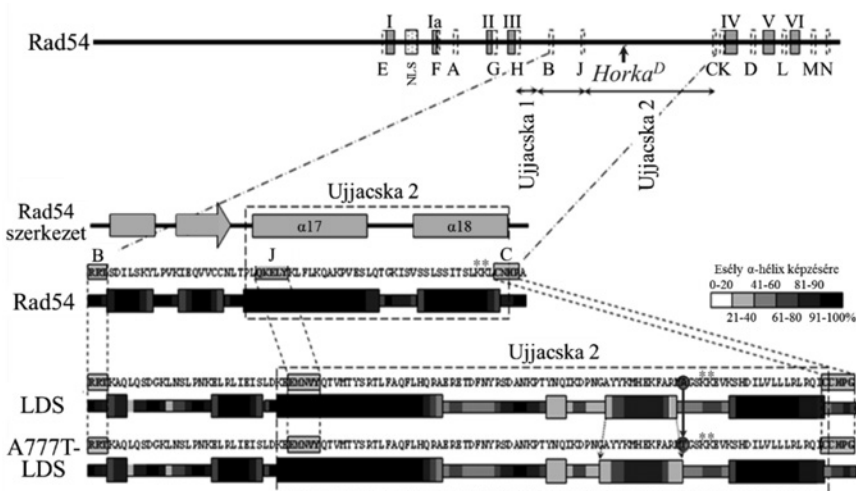
A *lodestar* gén molekuláris funkcióját megismerendő, a gént az ún. inverz PCR technikával klónoztuk (63. ábra). Miután megklónoztuk a *lodestar* gént, lehetőségünk nyílt molekuláris funkciója megismerésére. Előbb azonban tekintsük át, hogy mit tanultunk *Horka<sup>D</sup>*-ről. A *Horka<sup>D</sup>* allél szekvenálása után arra derült fény, hogy az EMS-mutagenézis (8. ábra) következményeként a *lodestar* gén 2424 G $\equiv$ C bázispárja A=T-re cserélődött. A csere következményeként az LDS fehérje 777. aminosava – egy alanin – helyére treonin került. Vagyis a *Horka<sup>D</sup>*-vel kapcsolatos furcsaságok egyetlen bázispár, és egyetlen aminosavcsere következményei, az A777T-LDS fehérjemolekulákkal kapcsolatosak (Szalontai et al. 2009).

A Rad54- és a *lodestar*-kódolt fehérjék összehasonlítása alapján valószínűsíthető a A777T-LDS fehérjével kapcsolatos rendellenességek oka is: az alanin  $\rightarrow$  treonin aminosav csere nyomán az A777T-LDS molekulákban két aminosavval meghosszabbodott az az  $\alpha$ -hélix rész, amellyel a DNS nagy árkába fekszenek. Az A777T-LDS molekulák mintegy „ragadóssá” váltak, csak nehezen válnak le a kromatintról (64. ábra; Szalontai et al. 2009).

Azt, hogy az A777T-LDS fehérjemolekulák valóban ragadósak, úgy bizonyítottuk, hogy kétféle nőtényt készítettünk. Az egyik típus nőtényei olyan transzgén hordoztak, amely LDS-RFP molekulák képződését kódolta. A másikban a transzgén A777T-LDS-RFP képződését kódolta (65. ábra; Gáspár et al. kézirat). (A  $TG^{LDS-RFP}$  transzgén hordozó *horka<sup>FP</sup>/-* nőtények fertilisek, jelezve, hogy a transzgén által kódolt LDS-RFP molekulák funkcióképesek. A  $TG^{A777T-LDS-RFP}$  transzgén hordozó nőtények – akik a transzgén mellett két ép *lodestar<sup>+</sup>* gént is hordoznak – jőszerivel sterilek, jelezve, hogy az A777T-LDS-RFP molekulák kifejtik áldatlan hatásukat.) A kétféle nőtény petéiben úgy követtük konfokális mikroszkóppal az embriogenezist, hogy figyelmünket a vörös fluoreszkáló LDS-RFP, illetve

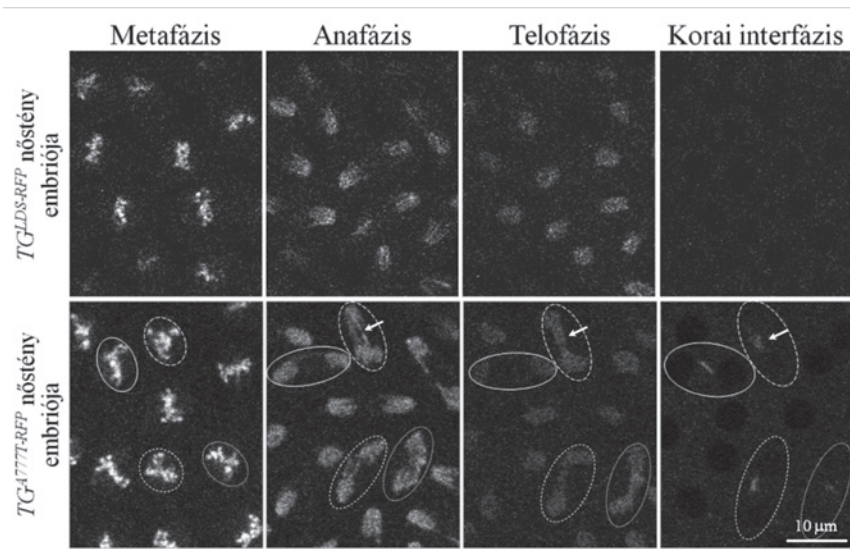


**63. ábra. Az inverz-PCR technika elvi alapjai.** P-elemet tartalmazó DNS-t (amit *horka<sup>FP</sup>/-* muslicákból izoláltunk) restrikciós enzimmel ( $\curvearrowright$ ) emésztettünk. A képződő DNS-fragmenseket gyűrűkké ligáltuk. A P-elem szekvencia alapján primereket terveztünk, amelyekről – szemben a hagyományos PCR elrendezéssel – fordítva, „kifelé” indult a DNS-szintézis. A képződött PCR-termék a P-elemmel szomszédos gén része, belőle kiindulva megklónozható a P-elemet tartalmazó gén, esetünkben a *lodestar* (Szalontai et al. 2009).



**64. ábra. A Rad54, az LDS és az A777T-LDS fehérjék szekvenciárészeinek összehasonlítása.** Mindhárom fehérje féleségben könnyen felismerhetők a B, a J és a C motívumok, valamint az a két pozitív töltésű lizin (K\*K\*), amelyekkel a fehérjemolekulák a DNS-hez kötődnek. Egy szoftver alapján arra következtettünk, hogy az alanin → treonin csere nyomán megnőtt annak esélye, hogy a csere szomszédságában levő, 11 aminosavból álló  $\alpha$ -hélix immáron 13-ból áll (Szalontai et al. 2009).

az A777T-LDS-RFP molekulákra fordítottuk (65. ábra). Munkánk eredménye két fontos megállapításban összegezhető. 1. Az LDS-RFP molekulák a metafázisban kivilágítják a kromoszómákat, majd a mitózis előrehaladtával leválnak róluk. A korai interfázisban már nem a sejtmagban, hanem a citoplazmában vannak (65. ábra). A LDS molekulák viselkedéséből következik, hogy a mitózisban, annak is a kezdeti szakaszában lehet fontos szerepük. 2. Az A777T-LDS-RFP molekulák jelenlétében a kromoszómák elrendeződése már a metafázisban is rendellenes, a mitózis előrehaladtával pedig kromatin-hidak alakulnak ki, és maradnak fenn az interfázisban is (65. ábra). Vélekedésünk szerint azért, mert a ragadós A777T-LDS-RFP molekulák a kromatinhoz tapadva maradnak. A kérdés megválaszolásán, hogy ti. az A777T-LDS molekulák általában a kromatinhoz vagy annak kitüntetett szakaszaihoz tapadnak, 2015 végén is dolgoztunk. És vajon mi az ép LDS fehérje funkciója?

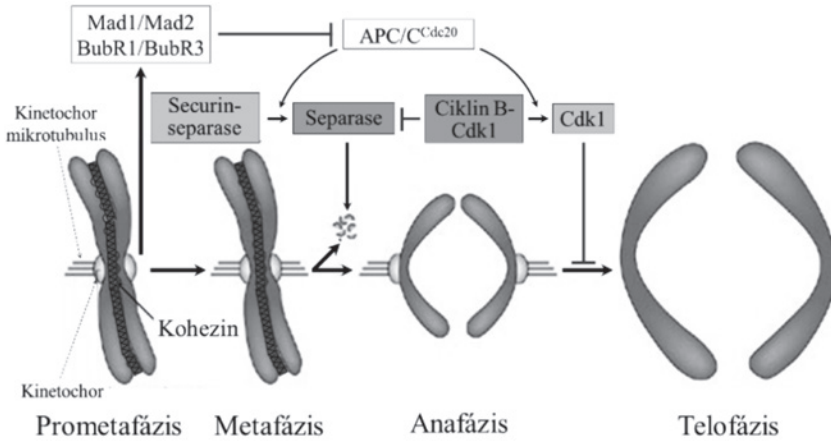


**65. ábra. Az A777T-LDS molekulák ragadósak.** Kromatinhidak képződését (↙) eredményezik. (Részletes magyarázat a szövegben.)

### *LDS fehérje, a kohezin komplexek és a metafázisú kromoszómák*

Minthogy az LDS fehérjemolekulák a metafázisú kromoszómákra telepsznek, feltételeztük, hogy valamely olyan fehérjemolekula-féleséggel lehetnek kapcsolatban, amely szintén része a metafázisú kromoszómáknak, és szerepe lehet a kromoszómák stabilitásában. Választásunk a kohezin komplexre, illetve annak egyik komponensére esett, az SMC1 (Structural maintenance of chromosomes 1) fehérjére (Jeppsson et al. 2014). A kohezin komplexek egészen addig tartják együtt a leánykromatidákat, ameddig az ún. orsó-összeszerelődést ellenőrző kontrollmechanizmus (angolul: spindle assembly

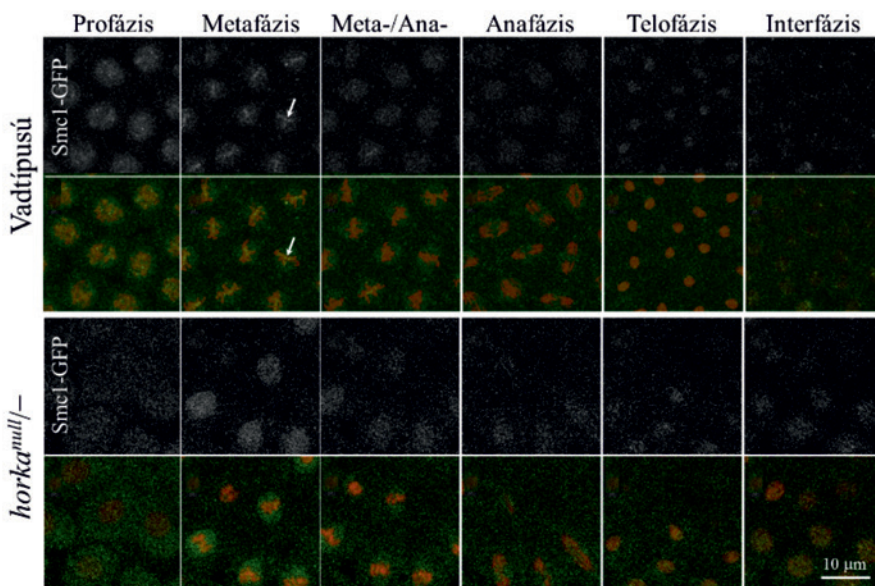
checkpoint, röviden SAC) mindent rendben talál (66. ábra). Olyan transzgént készítettük, amely SMC1-GFP molekulák képződését kódolja, és kivilágítja a kohezin komplexeket. Ezután olyan muslica nőtények embrióit vizsgáltuk, amelyekben a kromatin vörösén, a kohezin komplexek zölden voltak kivilágítva, és vizsgáltuk a jeleket a mitózis folya-



**66. ábra. Az orsó-összeszerelődést ellenőrző kontrollpont.** A leánykromatidákat a kohezin komplexek kapcsolják össze. Amennyiben a Mad és a BubR fehérjék rendben találják a metafázisú kromoszómák és a kinetochor mikrotubulusok kapcsolatát, a kohezin komplexeket a szeparáz enzim elbontja, ami után folytatódhat a mitózis (Peters 2006 nyomán; Soós és Szabad 2012).

mán konfokális mikroszkópban készített optikai metszetek alapján. Kétfajta nőtényt készítettünk: vad típusúakat, amelyek petéiben van LDS fehérje, és SMC1 is, valamint *horka<sup>RP</sup>/-* nőtényeket, amelyek petéiből hiányzik az LDS fehérje, ám van benne SMC1. Amint várható, a vad típusú nőtények embrióiban az SMC1 fehérjék kivilágították a metafázisú kromoszómákat, ám az anafázis kezdetére leváltak a kromoszómákról (67. ábra). Bár a *horka<sup>RP</sup>/-* nőtények embrióiban ugyanúgy vannak SMC1-GFP molekulák, mint a vad típusúakéban, azok – LDS fehérje hiányában – nem telepsznek a kromoszómákra (67. ábra). Vagyis: az LDS fehérje ahhoz szükséges, hogy a kohezin komplexek részévé váljanak az osztódásra készülő kromoszómáknak (Gáspár et al. kézirat). LDS fehérje hiányában a kohezin komplexek nem válnak a metafázisú kromoszómák részeivé, nem tudják együtt tartani a leánykromatidákat. Érthető tehát, hogy a *horka<sup>RP</sup>/-* nőtények embrióiban gyakoriak a rendellenes osztódások, és olyan sejtmagvak képződnek, amelyek a megszokottnál több vagy kevesebb kromoszómát hordoznak. A sok abnormális sejtmag miatt az embriók elpusztulnak, a *horka<sup>RP</sup>/-* nőtények sterilek.

A *Horka<sup>D</sup>* mutációból kiindulva a kromoszómastabilitás őrzőinek egyik fontos részvevőjét, a LODESTAR fehérjét, és annak funkcióját ismertük meg. Megtudtuk, hogy az 1061 aminosavból álló LDS fehérje 777. aminosavának alanin → treonin cseréje nyomán ragadós A777T-LDS fehérjemolekulák képződnek. A ragadósság vezet a kromoszómák instabilitásához, abnormális szétválásához az osztódások során (Szabad et al. 1995, Szalontai et al. 2009, Gáspár et al. kézirat). Az LDS fehérjemolekulák hiányában viszont



**67. ábra.** Az LDS fehérje ahhoz szükséges, hogy a kohezin komplexek a metafázisú kromoszómákra telepedjenek. A kohezin komplexeket egyik alkotójuk, a GFP-vel zölden kivilágított SMC1-GFP molekulák teszik láthatóvá. A kromoszómák az RFP-vel vörösen kivilágított egyik hiszton féleség nyomán vörösen fluoreszkálnak. A vadtípusú nőstények embrióiban, az LDS fehérje jelenlétében a kohezin komplexek a metafázisú kromoszómákra telepsznek, amit nem csak az erős SMC1-GFP jel mutat ( $\blacktriangleleft$ ), hanem a kromoszómák narancssárga színe is. A *horka<sup>pp/-</sup>* nőstények embrióiban bár jelen vannak a kohezin komplexek, az LDS fehérje hiányában nem telepsznek fel az abnormálisan elrendeződött, vörös színben fluoreszkáló kromoszómákra.

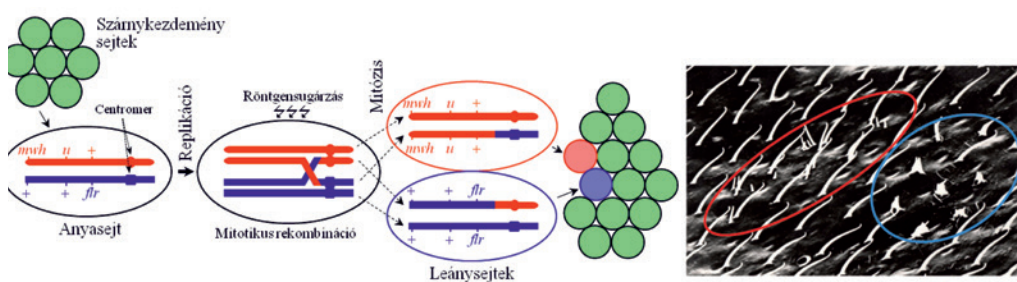


**68. ábra.** Gáspár Imre, Szalontai Tamás és Szikora Szilárd 2015 decemberében.

felborul az a kontroll-mechanizmus, amely a kromoszómák stabilitását biztosítja. Azt, hogy az LDS fehérje jelenléte valóban szükséges a kromoszómák stabilitásához, a következő fejezet is bizonyítja. A Horka-kutatások eredményeiből született Szalontai Tamás doktori disszertációja 2008-ban. A Horka témán Szalontai Tamással, Gáspár Imrével és Szikora Szilárddal volt/van szerencsém dolgozni (68. ábra).

## Mutagének és muslica mozaikok

Kutatómunkánk során lépten-nyomon hasznát húztunk a genetikai mozaikokból. Egyik kísérletsorozatban pl. azt tanulmányoztuk, hogy miként változik a sejtek fejlődési potenciálja a muslica szárnykezdeményekben a regeneráció folyamán. Véletlenszerűen jelöltünk meg genetikailag sejteket – röntgensugárzással indukált mitotikus rekombináció során –, és követtük nyomon utódsejtjeik sorsát a regeneráció folyamán. Megtudtuk, hogy regeneráció kezdetén a sejtek fejlődési potenciálja előbb mintegy „visszaesik” az embrionális sejteket jellemzőre, hogy aztán a regeneráció előrehaladtával ugyanazokat a döntéseket hozzák meg, mint a normális fejlődés során (Szabad et al. 1979b). Egy másik munkánkban azt tanulmányoztuk, hogy miként alakul a muslica azon szárnykezdemény sejtjeinek sorsa, amelyek mitotikus rekombináció nyomán homozigótává válnak az ún. *discless (dl)* mutációk valamelyikére (69. ábra; Szabad and Bryant 1982). (A *dl* mutációk bármelyikére homozigóta muslica lárvákban nem képződnek imágókorongok.) Olyan muslica lárvákban indukáltunk röntgensugárzással mitotikus rekombinációt, amelyek heterozigóták voltak valamelyik *dl* mutációra, és egyúttal két marker-mutációra is (69. ábra). Mitotikus rekombináció nyomán két leánysejt képződik: az egyik a *dl* mutációra és az egyik marker-mutációra, a másik leánysejt pedig a másik marker-mutációra vált homozigótává. Amennyiben nincs szükség az ép *dl<sup>+</sup>* gén funkciójára, a genetikailag megjelölt leánysejtek leszármazottai egy-egy, nagyjából azonos méretű mozaik foltot – ún. ikerfoltot – képeznek a kifejlett szárnyon (69. ábra). Ha viszont szükség van az ép *dl<sup>+</sup>* gén funkciójára, a *dl/dl* sejtek elpusztulnak, vagy sorsuk abnormálisan alakul, miközben a magányos társ-mozaikfolt fejlődése normális. Nos, amint megmutattuk, a *dl/dl* sejtek nem pusztulnak el, ám minthogy képződésük után csak kétszer-háromszor osztódnak, mindössze néhány utódsejtjük származik, amelyek az ikerfoltokban kis partnerfoltot képeznek (Szabad and Bryant 1982). Vagyis a *dl* mutációk olyan géneket azonosítanak,



**69. ábra. Sejtek genetikai megjelölése mitotikus rekombinációval, és mozaikfoltok képződése.**

Az *mwh u/flr* muslica szárnykezdemény sejtek némelyikében röntgensugárzással indukált mitotikus rekombináció nyomán két genetikailag megjelölt sejt képződik. Az egyik homozigóta az *u* (tetszőlegesen választott) mutációra, valamint az *mwh* (*multiple wing hairs*) marker-mutációra. A másik leánysejt a *flr* (*flare*) marker-mutációra vált homozigótává. A genetikailag megjelölt sejtek utódsejtjeikre örökölt tulajdonságait. Az utódsejtek együtt maradnak, és a kifejlett szárnyon mozaikfoltokat képeznek, amint az ábra jobb oldalán levő kép mutatja. Az *u* mutációra homozigóta sejtek sorsa attól függ, hogy szükség van-e az ép *u<sup>+</sup>* gén funkciójára az *u/u* sejtekben. (Részletes magyarázat a szövegben.) A kép jobb oldala pásztázó elektronmikroszkópban készült, és egy muslicaszárny egy részét mutatja.



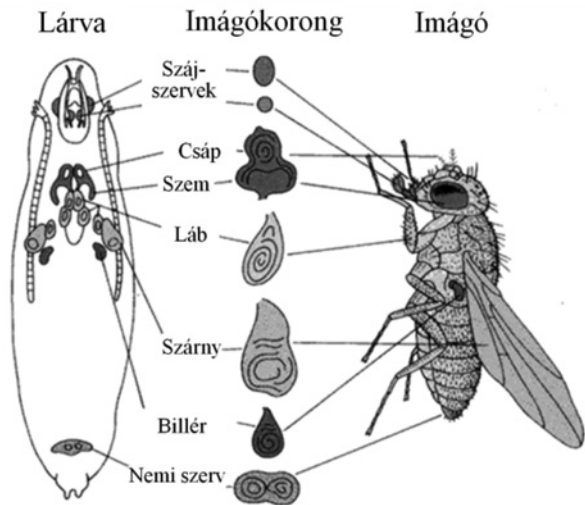
amelyek funkciójára a sejtosztódások során van szükség. A mitotikus rekombináció után képződő *dll/dll* sejtek azért képesek kétszer-háromszor osztódni, mert örökölték a *dll/dll<sup>+</sup>* anyasejt citoplazmáját, benne az ép *dll<sup>+</sup>* gén termékével (69. ábra). Ameddig az ki nem hígul és/vagy le nem bomlik, a *dll/dll* sejtek normálisan funkcionálnak. A jelenség lényegében a sejtek szintjén megnyilvánuló anyai hatás, amit a szakirodalom perduranciaként ismer (Garcia-Bellido and Merriam 1971a; Szabad 1998). (Ritkán, ám előfordul, hogy valamely mutációra homozigóta sejteket a környező heterozigóta társak kisegítik; a mutációval kapcsolatos tulajdonság nem sejt-autonóm.) A mutációk mozaikanalízise alapján megbecsülhető, hogy mely sejt-típusban a gének hányad részének funkciójára van szükség (Szabad 1998).

### *A muslica szárnykezdemények fejlődése és a marker-mutációk*

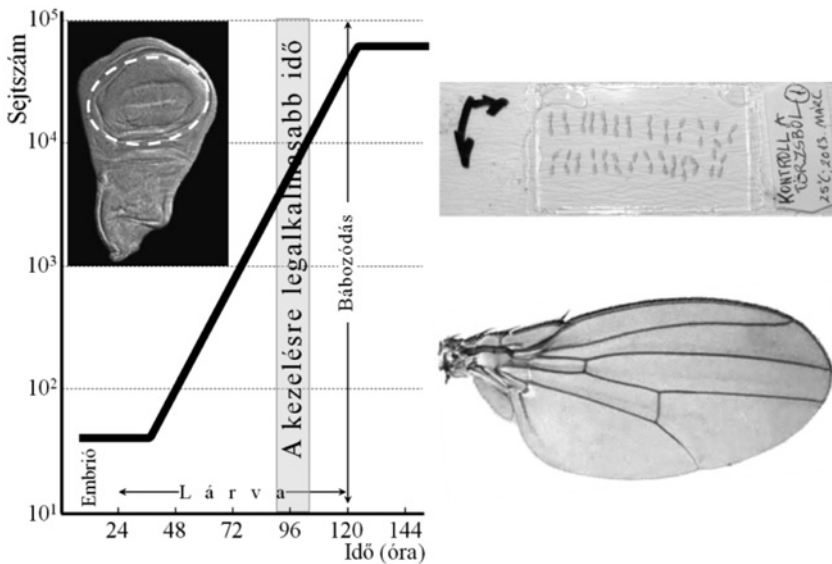
A kifejlett muslica epidermisze kis kezdeményekben, ún. imágókorongokban fejlődik (70. ábra). (Az imágókorongok imaginális diszkusz néven is ismertek.) Az imágókorongok az embrionális életszakaszban alakulnak ki. Az őket alkotó diploid sejtek mitózisok sorozatával szaporodnak a lárva életszakaszban. A bábozódás után foglalják el végső helyüket, és kutikulát választanak ki.

A szárny-imágókorong alighanem a legismertebb szervkezdemény (Handke et al. 2014). Belőlük fejlődnek ki a szárnyak, valamint a tor bizonyos részei. Kezdeményei az embrionális élet során alakulnak ki, egyenként 30-50 sejtből. A szárnykezdemény sejtek diploidok, és a lárvaállapot elején kezdenek el osztódni. Bennük a mitózisok kb. tízóránként követik egymást, miközben a sejtszám exponenciálisan növekszik (71. ábra; Bryant and Levinson 1985). A sejtosztódások eredményeként a sejtszám 10-11 sejtciklus során nagyjából 100 óra alatt 50 ezerre nő (Bryant 1970, Garcia-Bellido and Merriam 1971b). Az 50 ezer sejtből 30 ezer alkotja a szárnylemez alsó és felső felszínét. A bábozódás kezdetén megszűnnek a sejtosztódások, a sejtek elfoglalják végső helyüket, és kutikulát választanak ki (71. ábra). A szárnyak lényegében olyan kávékkal erősített kitinlemezek, amelynek mindkét fel-színe elhalt sejtek terméke.

A szárny-imágókorongok osztódó sejtjei ideális „eszközök” arra, hogy a bármelyikükben bekövetkező genetikai változást utódsejtjeikre örökítsék, amik – miután a szárnyak kialakulnak –, mozaikfoltot képeznek (Szabad 2009). Különösen hasznos tulajdonsága a



**70. ábra.** A muslica epidermiszt alkotó sejtek a lárva életszakaszban ún. imágókorongokban fejlődnek.



**71. ábra. Egy muslica szárny-imagókorong fejlődése, egy szárnypreparátum, valamint egy szárny képe.** A szárnyat alkotó sejtek arról a területéről származnak, amely a betétképen bemutatott szárny-imagókorong fehér szaggatott vonalon belüli része. (Bryant and Levinson 1985 nyomán.) Egy szárnyat nagyjából 30 ezer sejt alkot.

szárnysejteknek, hogy mindegyikük egy-egy szőrszálát képez, ami lehetővé teszi, hogy – alkalmas marker-mutációval – akár egyetlen szárnysejt genotípusát meghatározzuk. A muslica bő százéves genetikai múltjának egyik hozadéka a marker-mutációk sokasága (García-Bellido and Dapena 1974). Közülük is kiemelkedik az *mwh* (*multiple wing hairs*): az *mwh* homozigóta sejtek mindegyikéből 2-7 szőrszál ered, szemben a szokásos eggyel (69. ábra; lásd a <http://flybase.org/> forrást). A szárny-imagókorongok ismerete, valamint a marker-mutációk bőséges tárháza tette lehetővé olyan tesztek kimunkálását, amelyekkel nemcsak kimutathatjuk a legkülönbébb környezeti és genetikai hatások mutációt okozó (mutagén) képességét, hanem meg is mérhetjük annak erősségét. A tesztek megszületésében fontos motiváció volt az is, hogy az 1970-es években vált nyilvánvalóvá, hogy minden mutagén egyben rákkeltő is (Szabad 2006a és 2006b).

### A mutációk típusai

Mutáción az örökítő anyagban hirtelen bekövetkező, és öröklődő változásokat értjük. Három típusát szokás megkülönböztetni.

1. A pontmutációk a DNS rövid szakaszát érintik. Bázispár-cserék, néhány bázispár kiesése vagy betoldása nyomán jönnek létre.
2. A kromoszómatörések a DNS mindkét szálának szakadását jelentik. Következmenyei szerterágazóak. Minthogy a mitotikus rekombináció alapja a kromoszómák törése, alkalmas indikátora a biológiai, kémiai és fizikai hatások kromoszómatörő képességének.

3. Kromoszómák vesztese és/vagy „nyerése”. Közismert tény, hogy az aneuploid sejtek – amelyek kromoszómaszáma a normális  $2n$  diploid helyett általában  $2n-1$ , vagy  $2n+1$  – elpusztulnak, vagy funkciójuk tökéletlen, és gyakorta daganatok kiindulási gócai (Soós és Szabad 2012, Giam and Rancati 2015).

Az általunk kidolgozott mutagén hatás tesztelésére alkalmas eljárások az itt említett háromféle genetikai esemény kimutatását és erősségének mérését teszik lehetővé. Alapjuk a muslica, annak szárnykezdeményei, és többnyire az *mwh* marker-mutáció. A muslicával gyűjtött megfigyelések minden bizonnyal az emberre is érvényesek, hiszen a DNS, a kromoszómák, a biokémiai reakciók szintjén nincsenek lényeges különbségek az ember és a muslicák között (Szabad 2009).

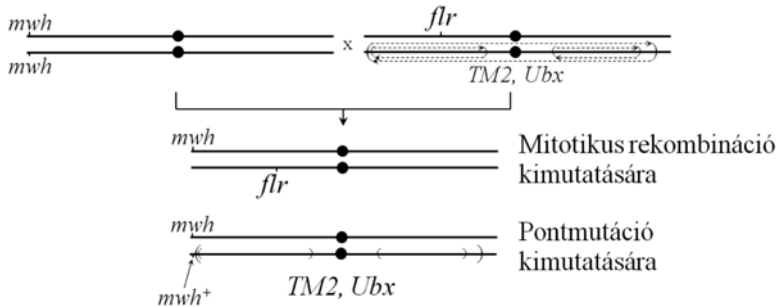
### *Foltok, méretük és a mutagén hatás erőssége*

A muslica szárnykezdeményt alkotó sejtek száma exponenciálisan növekszik a lárvaállapot folyamán (71. ábra; Bryant 1970, Garcia-Bellido and Merriam 1971b, Bryant and Levinson 1985). Nyilvánvaló, hogy ha a genetikai változás akkor következik be, amikor a szárny-imágókorong még kevés sejtből áll, csak kevés, ám nagyon nagy mozaikfolt képződik. Ám ha a genetikai változás akkor történik, amikor a szárny-imágókorongot már nagyon sok sejt alkotja, sok, ám kis folt képződik. Minthogy az imágókorong sejtek mindegyike lényegében azonos mértékben járul hozzá a szárny kifejlődéséhez, a mozaikfolt mérete ( $m$ ) alapján meghatározható, hogy hány sejtből áll egy szárnykezdemény a genetikai esemény bekövetkeztekor: annyból, ahányad részét a genetikailag megjelölt sejtek a szárny összes sejtjének kiteszik. Vagyis, ha egy kifejlett szárnyat  $C$  sejt alkot (ami kb. 30 ezer), és egy ikerfoltban  $m$  sejt van, egy imágókorongban a mitotikus rekombináció bekövetkeztekor  $C/m$  sejt van. (Amennyiben a mitózist követően csak az egyik leánysejt van megjelölve, úgy  $m$ -et kettővel szorozzuk.) Ha tehát egy kísérletben  $N$  szárnyat vizsgálunk meg, a hatásnak kitett sejtek száma  $= N C/m$ . Lévén, hogy egy-egy mozaikfolt egy-egy olyan sejtből ered, amelyben mitotikus rekombináció történt, és az  $N$  szárnyon  $n$  mozaik folt képződött, a mozaikfoltok képződésének gyakorisága, vagyis a mutagén hatás erőssége  $f = n m/N C$  (Szabad et al. 1983, Szabad et al. 2012).

Ha a mozaikfoltok gyakorisága szignifikánsan meghaladja a kontroll értékét, kijelenthetjük, hogy a tanulmányozott hatás mutagén, képes mutációk indukciójára. A mutagén hatás erősségét pedig az  $f = n m/N C$  összefüggéssel mérhetjük. A teszt-rendszerek érzékenysége akkor jó, ha sok sejtet tehetünk ki a vizsgált hatásnak, vagyis viszonylag „idős” lárvákat kezelünk. Olyanokat, amelyekben bár egy-egy szárny-imágókorong már több ezer sejtből áll, ám azok még osztódnak, genetikai megjelöltségüket átörökíthetik utódsejtjeikre. A kezelésre legalkalmasabb életkor a pete lerakását, az embriogenezis kezdetét követő 96. óra körül van. Ilyenkor egy szárnylemez kezdeményben már mintegy háromezer sejt van. Ha egy kísérletben mondjuk száz szárnyat vizsgálunk át, a tanulmányozott hatásnak kitett sejtek száma több, mint százezer! Minthogy a 96. órától még két-három mitózis van hátra, az ilyentájt indukált, és *mwh*-jelölt mozaik foltok 2-4 sejtből állnak, könnyen felismerhetők. A kezelt lárvákból kifejlődő muslicák szárnyaiból preparátumot készítünk, amelyeket mozaikfoltok után kutatva vizsgálunk (71. ábra).

## Kromoszómatörések és foltos szárnyú muslicák; a SMART teszt

Az ún. SMART (somatic mutation and recombination test) módszert annak tudatában alkottuk meg az 1980-as évek elején, hogy (i) a mitotikus rekombináció a kromoszómatörések indikátora, és hogy (ii) kiváló marker-mutációk léteznek a mitotikus rekombináció kimutatására (Szabad et al. 1983). (A SMART név Fritz Würigler svájci kutatótól származik; Graf et al. 1984.) Az eljárás lényege az, hogy *mwh/mwh* és *flr/TM2, Ubx* muslica szülőket keresztezünk (72. ábra). A szülőktől többnyire nyolc órán át gyűjtünk petéket,



**72. ábra. Egy genetikai keresztezés sémája.** A keresztezés során *mwh/mwh* szülőket keresztezünk *flr/TM2, Ubx*-ekkel. *TM2, Ubx* egy olyan, ún. balanszer kromoszóma jele, amely minthogy három inverziót hordoz, lényegében megakadályozza a homológ kromoszómák közötti rekombinációt. (A vékony szaggatott nyilak az inverziók egyik töréspontjától a másikig futnak. *Ubx* egy domináns marker-mutáció jele.) Az *mwh/flr* utódok szárnyai a kromoszómatörések (közelebből a mitotikus rekombinációk), az *mwh/TM2, Ubx*-eké az *mwh*<sup>+</sup>génben bekövetkezett pontmutációk kimutatására szolgál.

a belőlük kifejlődő lárvákat négy nap múltán tesszük ki annak a hatásnak, amely kromoszómatörő képességét vizsgáljuk. Olykor csak néhány percre (mint pl. a röntgen- vagy  $\gamma$ -sugárzás esetében), néhány órára (mint amikor pl. etil-metánszulfonát oldatban „fűrésztöttük” a lárvákat), vagy olyan táptalajra tesszük őket, amelybe belekevertük a tanulmányozott vegyületet (pl. formaldehidet). Fontos, hogy a hatás *in vivo* természetű, vagyis a hatóanyagok élő lárvák élő sejtjeiben fejtik ki hatásukat. Lehetőség van arra is, hogy az ún. indirekt mutagének a lárvákban átalakulhatnak, és a belőlük képződő származékok okozhatnak mutációkat. A lárvákból kifejlődő *mwh/flr* utódok szárnyaiból preparátumot készítünk, a szárnyakat mikroszkópban 400-szoros nagyítással vizsgáljuk. Szárnyanként feljegyezzük a mozaikfoltok típusát (iker-, *mwh* vagy *flr* magányos folt), számát, méretét és helyét.

A SMART technikával gyűjtött eredményeink egy csokrát a 3. táblázat foglalja össze. Bár kis gyakorisággal ( $3,2 \times 10^{-5}$ ), mitotikus rekombinációk mindenféle kezelés nélkül is történnek a mitózissal szaporodó sejtekben. A jelenség nem meglepő, hisz’ a sejtek életéhez hozzátartoznak a DNS kettős szálú törései, és azok javítgatása. (A szakterület értékét Tomas Lindahl, Paul Modrich és Aziz Sancar 2015-ben kiérdemelt Nobel-díja jelzi.) Azt gondolom, hogy a 3. táblázat adatai magukért beszélnek. Az általunk kifej-

3. táblázat. Mozaik foltok indukciójának gyakorisága *mwh/flr* muslicák szárnyain

Kezelés	Szárny <i>N</i>	Mozaik folt			A mozaik foltok gyakorisága <i>n/N</i>	A mozaik foltok mérete (sejt/folt) <i>m</i>	A mozaik foltok indukciójának gyakorisága $f = n \cdot m/N \cdot C$	Referencia	
		Iker	Magányos						Összes <i>n</i>
			<i>mwh</i>	<i>flr</i>					
Kontroll	40	1	30	1	32	$1,2 \pm 0,8$	$3,2 \times 10^{-5}$	Szabad and Bryant 1982	
Kolhicin 7 $\mu\text{g/ml}$ , táptalajban, 3–4 napon át	40	2	25	0	27	$3,4 \pm 1,7$	$7,5 \times 10^{-5}$	Szabad 1986	
$\gamma$ -sugárzás 1500 Rad, 94–98 órás lárvák	6	50	53	12	115	19,2**	$6,2 \times 10^{-3}$	Szabad and Bryant 1982	
Etil-metánszulfonát 1 mg/ml, táptalajban, 3–4 napon át	18	38	141	17	179	10,9**	$2,5 \times 10^{-3}$	Szabad 1986	
Formaldehid 1,5 mg/ml, táptalajban, 3–4 napon át	60	n.d.	n.d.	n.d.	256	4,3**	$9,1 \times 10^{-4}$	Szabad et al. 1983	
Hexametil-foszforsav-triamid 1%, táptalajban, 3–4 napon át	13	n.d.	n.d.	n.d.	88	6,8**	$2,5 \times 10^{-3}$	Szabad and Bennetová 1986	
<i>N</i> -nitrozo-morfolin 0,64 mmol/kg, táptalajban, 3–4 napon át	16	n.d.	n.d.	n.d.	70	4,4**	$2,5 \times 10^{-4}$	Surján et al. 1985	
<i>N</i> -metil- <i>N</i> -nitrozo- <i>p</i> -toluolszulfonsavamid 4,67 mmol/kg, táptalajban, 3-4 napon át	40	n.d.	n.d.	n.d.	86	2,2**	$1,8 \times 10^{-4}$	Surján et al. 1985	
<i>N,N</i> -dinitrozo 2,6 bisz-hidroximetil-piridin-bisz -etilkarbamát 6,43 mmol/kg, táptalajban, 3–4 napon át	39	n.d.	n.d.	n.d.	91	2,3**	$1,9 \times 10^{-4}$	Surján et al. 1985	

**Megjegyzések**

- Átlag  $\pm$  szórási
- \*\* a kontrolltól  $P < 0,01$  szinten szignifikánsan különbözik.
- A négynél kevesebb sejtből álló *flr* homozigóta sejték fenotípusa nem nyilvánul meg. Azért, mert életük *flr/+* sejtekből indul, és az a funkcióképes ép *flr* géntermék megakadályozza az *flr* mutáns fenotípus kifejlődését.
- A magányos *mwh* foltok képződésének legvalószínűbb okai a következők: (i) a kis *flr* partner folt nem fejlődik ki. (ii) a mitotikus rekombináció az *flr* és az *mwh* marker-mutációk között következett be. (iii) Pontmutáció történt az *mwh*<sup>+</sup> génben.
- A magányos *flr* foltok zöme két mitotikus rekombináció következménye. Egyik a centromer és az *flr*, a másik az *flr* és az *mwh* marker-mutációk között következett be.
- A nitrozevegyületek a környezetszennyezés szempontból fontos, lehetséges rákkeltők (Surján et al. 1985).

lesztett SMART technika széles körben elterjedt (Marcos and Carmona 2013). 2014-ig mintegy 300 különféle hatás kromoszómatoró képességét vizsgálták meg vele (Marcos et al. 2014). Sőt, 2015-ben Lombardot és munkatársai olyan automata megoldást tettek közzé, amellyel gyorsan lehet a szárny mozaikfoltjait detektálni, jellemezni. Mi elégedettek vagyunk a SMART technika sikerével: 2015 végéig több mint százszor hivatkoztak az 1983-ban megjelent (Szabad et al. 1983) dolgozatunkra.

### *Pontmutációk és foltos szárnyú muslicák*

A 72. ábrán bemutatott keresztezésből *mwh/TM2* utódok is származnak. Szárnyaikon lényegében három genetikai esemény nyomán képződhetnek *mwh* mozaik foltok. (i) Ha valamely szárny-imagókorong sejtben, a *TM2* kromoszóma *mwh*<sup>+</sup> génjében pontmutáció következik be (miközben egy új *mwh* mutáns allél képződik). (ii) Elvész, deletálódik az *mwh*<sup>+</sup> gén. (iii) Génkonverzió nyomán az *mwh*<sup>+</sup> gén helyén *mwh* allél képződik. (Zárójelben jegyzem meg, hogy a két utóbbi esemény meglehetősen ritka.) A kromoszómatorést követő mitotikus rekombináció nyomán aligha képződnek életképes sejtek. Azért, mert a *TM2* kromoszóma három inverziót is hordoz (72. ábra), és rekombináció nyomán olyan leánysejtek képződnek, amelyekből a genom nagy szakaszai hiányoznak, illetve vannak jelen számfeletti kópiában.

Az *mwh/TM2*-es muslicák szárnyainak mozaikosságára a 4. táblázatban mutatunk eredményeket. Mutációk, amint az az 1950-es évek óta ismert, spontán is bekövetkeznek. A spontán mutációk gyakorisága muslicában  $10^{-5}$ – $10^{-4}$  mutáció/gén/generáció között változik, a gén méretétől függően. Az általunk mért  $1,4 \times 10^{-5}$  érték az *mwh*<sup>+</sup> → *mwh* mutációgyakoriság szépen illik korábbi ismereteinkbe, és mutatja az *mwh/TM2* muslicák alkalmasságát pontmutációk kimutatására, és erősségének mérésére. Vélekedésünket erősítik az etil-metánszulfonáttal (EMS) kapcsolatos eredményeink (4. táblázat). Viszonylag kis koncentrációjú, és rövid EMS-kezelés a pontmutációk gyakoriságát százszorososan fokozza (4. táblázat). Fontos eredménynek gondoljuk, hogy a nitrozoszarmazékoknak is van mutagén hatása. Egyikük-másikuk növényvédő szerek bomlásterméke, vagy gyógyszerekből képződik a gyomrukban nitrtek jelenlétében (4. táblázat; Surján et al. 1985). Minthogy az *mwh/flr* és az *mwh/TM2* lárvák ugyanabból a keresztezésből származnak, és egyszerre tesszük ki őket a tanulmányozott hatásnak, a kétféle hatás összehasonlítható (Surján et al. 1985).

### *Kromoszómavesztés és a foltos szárnyú muslicák*

A legtöbb magasabb rendű élőlény élete egy női-, valamint egy hímvarsejt fúziójával kezdődik. Sejtjeik diploidok (2n): egy-egy anyai- és apai eredetű kromoszómagarnitúrát hordoznak. Sejtjeink (és természetesen mi is) akkor érzik jól magukat, ha bennük két kromoszómagarnitúra van. Megsínylik, ha kromoszómát „nyernek”, vagy pláne ha veszítenek. Az ún. aneuploid sejtek, amelyekben a megszokottal szemben általában eggyel több (2n+1) vagy eggyel kevesebb (2n-1) kromoszóma van, többnyire elpusztulnak (különösen, ha a „nyert” vagy elvesztett kromoszóma a nagyobbak közül való). Ám ha

4. táblázat. Mozaikfoltok indukciójának gyakorisága  $mwh/IM2$  muslicák szárnyain

Kezelés	Szármay <i>N</i>	<i>mwh</i> mozaik- folt <i>n</i>	A mozaik- foltok gyakorisága <i>n/N</i>	A mozaik- foltok mérete (sejt/folt) <i>m</i>	A mozaikfoltok indukciójának gyakorisága $f = 2n m/N C$	Referencia
Kontroll	116	9	0,08	2,7 ± 1,4	1,4 × 10 <sup>-5</sup>	Surján et al. 1985
Etil-metánszulfonát 1 mg/ml, 4 órán át	12	44	3,7**	7,4 ± 3,2	1,8 × 10 <sup>-3</sup>	Szabad 1986
Hexametil foszforsav triamid; 1%, táptalajban, 3-4 napon át	13	88	6,8**	2,7 ± 1,6	7,0 × 10 <sup>-4</sup>	Szabad and Bennettová 1986
N-nitrozo-morfolin 0,64 mmol/kg, táptalajban, 3-4 napon át	14	9	4,4**	3,6 ± 2,6	1,5 × 10 <sup>-4</sup>	Surján et al. 1985
N-metil-N-nitrozo-p-toluolszulfonsavamid 4,67 mmol/kg, táptalajban, 3-4 napon át	65	32	0,5**	2,5 ± 1,6	8,2 × 10 <sup>-5</sup>	Surján et al. 1985
N,N-dinitrozo-2,6-bisz-hidroximetil-piridin-bisz- metilkarbamát 6,43 mmol/kg, táptalajban, 3-4 napon át	38	14	0,4**	2,4 ± 1,4	5,9 × 10 <sup>-5</sup>	Surján et al. 1985

**Megjegyzések**

- Átlag ± szórá
- \*\* a kontrolltól P<0,01 szinten szignifikánsan különböző gyakoriság.
- A nitrozevegületek a környezetszennyezés szempontjából fontos, lehetséges rákkeltők (Surján et al. 1985).

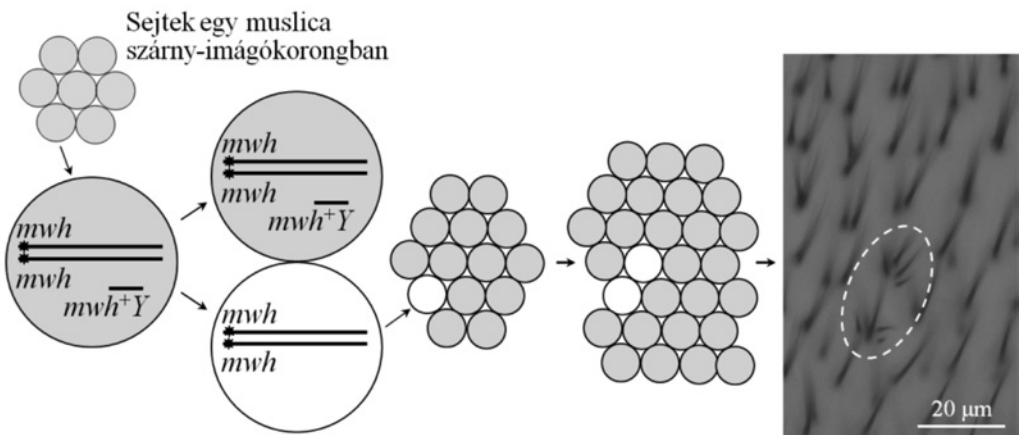
életben maradnak, abnormálisan funkcionálnak, és gyakorta rákos daganatok kiindulási gócai. Az aneuploid állapot és a daganatképződés kapcsolata oly szoros, hogy a kromoszómafelesleg és/vagy -hiány a rákos daganatok egyik ismérve (Giam and Rancati 2015).

A kromoszóma-„nyerést” és/vagy -vesztést elkerülendő az evolúció folyamán olyan mechanizmusok alakultak ki, amelyek őrzik kromoszómáink stabilitását, illetve olyan is, amely igyekszik kigyomlálni az olyan sejteket, amelyek genetikai állománya eltér a  $2n$ -tól. A kromoszóma/genom stabilitás őrzésének egyik fontos eleme az „orsó-összeszerelődést ellenőrző pont” (angolul Spindle Assembly Checkpoint, SAC; 66. ábra). A SAC csak azután engedélyezi, hogy mitózis metafázisát kövesse az anafázis, ha minden rendben találtatott (Soós és Szabad 2012). Ha a sejtosztódás során mégis hiba történne, az aneuploid sejtekre az ún. mitotikus katasztrófa mechanizmus vár, amely arra hivatott, hogy (i) – a centroszómák inaktíválása révén – megakadályozza az aneuploid sejtek osztódását, és (ii) arról is gondoskodik, hogy a szóban forgó sejtek elpusztuljanak (Soós és Szabad 2012).

### A CLADS technika

Az elmúlt néhány évtized során sok olyan módszert dolgoztak ki, amelyek a legkülönbébb hatások pontmutációt indukáló és/vagy kromoszómatörő képességének kimutatására alkalmasak. Ám olyat nem, amely a genetika eszköztárával, soksejtű élőlényben mutat ki kromoszómanyerést és/vagy -vesztést, és amely rutinszerűen használható is. Az elsőt mi dolgoztuk ki, és publikáltuk 2012-ben, és neveztük el CLADS technikának (chromosome loss assay in *Drosophila* soma; Szabad et al. 2012, Soós and Szabad 2014).

A módszer elvi alapja a következő (73. ábra). Muslicában az Y kromoszóma hiánya, vesztese nem befolyásolja a sejtek életképességét. (Az X0 muslica hímek életképesek, ám sterilek. És – amint korábban láthattuk – az XX//X0, nőstény//hím mozaik muslicák is életképesek. A muslica Y kromoszóma mindössze kilenc gént hordoz. Legtöbbjük funkciója a spermiumfarok mozgatásához szükséges.) Az ötlet a következő: készítsünk egy



**73. ábra. Az  $mwh^+Y$  kromoszóma vesztese nyomán  $mwh$  mozaikfolt képződik.**  
(Részletes magyarázat a szövegben.)



olyan  $mwh^+Y$  kromoszómát, amelybe az ép  $mwh^+$  gént tartalmazó transzgént ékelünk be. (Az  $mwh^+Y$  kromoszóma elkészítése két évünkbe telt. Azért, mert az  $Y$  kromoszóma zömét heterokromatin alkotja, amibe nem egyszerű transzgéneket beékelni. Különleges megoldásokkal tudtuk elérni célunkat; Szabad et al. 2012.) Bár az  $X/mwh^+Y$ ;  $mwh/mwh$  muslica hímek homozigóták az  $mwh$  recesszív marker-mutációra, szárnysejtjeik mindegyike mégis csak egyetlen szőrszálat képez. Azért, mert funkcionál bennük az ép  $mwh^+$  gén. Ellenben, ha elvész az  $mwh^+Y$  kromoszóma, a leánysejtek egyike és annak utódsejtjei immáron mutathatják az  $mwh$  mutáció fenotípusát: sejtenként 2-7 szőrszálat képeznek (73. ábra). Ha tehát  $X/mwh^+Y$ ;  $mwh/mwh$  muslica lárvákat teszünk ki olyan hatáson, amely kromoszómavesztést okoz, várható, hogy szárnyaikon a kontrollt meghaladó gyakorisággal képződnek  $mwh$  mozaik foltok. A kromoszómavesztés erősségét a már ismert  $f = n \cdot 2m/N \cdot C$  összefüggéssel mérhetjük (Szabad et al. 2012). A CLADS technika használhatóságát az 5. táblázatban összefoglalt eredményeink mutatják.

Az  $mwh^+Y$  kromoszóma bár kis gyakorisággal ( $1,7 \times 10^{-4}$ ), de el-elvész. A vesztés gyakoriságát fokozza a *Horka*<sup>D</sup> mutáció kódolt A777T-LDS fehérje jelenléte, valamint az LDS fehérje hiánya is (a *horka'*/– sejtekben), jelezve, hogy az LDS fehérjének valóban fontos szerepe van a kromoszómák stabilitásában (5. táblázat; Szabad et al. 2012). A kolhicin drámai hatása nem meglepő, hisz' tudott, hogy a mikrotubulusok szétejtésével zavarja, akadályozza a sejtosztódásokat. Érthető a formaldehid – a sejtalkotó szerves molekulákat keresztbekötő egyik vegyület – kromoszómavesztést indukáló erős hatása is. Ám az EMS-é, pontmutációk indukálására használt vegyület kromoszómavesztést indukáló hatása meglepő (Szabad et al. 2012).

A CLADS technika használhatóságát illusztrálandó vizsgáltuk meg a benzol – egy ismert kromoszómavesztést indukáló vegyület –, egy parkettalakk, valamint egy hígító hatását az  $mwh^+Y$  kromoszóma vesztésére (Soós and Szabad 2014). Úgy, hogy ismert koncentrációban benzolt, parkettalakkot vagy hígítót tartalmazó zárt légtérben tartottunk  $X/mwh^+Y$ ;  $mwh/mwh$  muslica lárvákat. Az eredmények több szempontból is meglepőek. A kontrollban az oxigénfogyás következményeként a „szabadtérinél” nagyobb gyakorisággal képződtek  $mwh$  mozaik foltok (164/108 és 259/64; 5. és 6. táblázat). A magyarázat a magorsó-rendszer tökéletlen funkciójában rejlik, ami pedig a csökkent oxigén és ATP-ellátottsággal kapcsolatos. A 24 órán át mindössze 47 ng/ml-nyi benzolt tartalmazó légkörben tartott muslica lárvákban a kontrollt szignifikánsan meghaladó gyakorisággal képződtek  $mwh$  mozaikfoltok. A 175 ng/ml benzolt tartalmazó légkörben már négyórányi benzolgőz kezelés is hatásos volt (6. táblázat). Bár kis gyakorisággal, de a parkettalakk telített gőze, valamint a hígító gőze is okoz kromoszómavesztést, ami minden bizonnyal az aromás szénhidrogének, illetve olyan származékainak tudható be, amelyek a szervezetben képződnek (Soós and Szabad 2014). Eredményeink nemcsak megerősítették a benzol kromoszómavesztést indukáló hatását, hanem felhívják a figyelmet arra a veszélyre, ami az aromás szénhidrogének, a kromoszómavesztés és a daganatképződés között fennáll. Tudta a kedves olvasó, hogy a dohányfüst módfelett gazdag benzolban, és más aromás szénhidrogénekben, köztük benzpirénben?

Örök kérdés, hogy a muslica mennyire alkalmas mutagén hatás kimutatására, illetve hogy érvényesek-e a muslicával gyűjtött adatok emberre is. Közismert, hogy azok a

**5. táblázat. Az *mwh*<sup>+</sup>*Y* kromoszómavesztése különféle hatások nyomán**

Kezelés	Szárnny	<i>mwh</i> mozaik-folt	A mozaik-foltok gyakorisága	A mozaik-foltok mérete (sejt/folt)	A mozaik-foltok indukciójának gyakorisága
	<i>N</i>	<i>n</i>	<i>n/N</i>	<i>m</i>	$f = n \cdot 2m/NC$
Kontroll	108	164	1,5	1,7 ± 1,0	1,7 × 10 <sup>-4</sup>
<i>Horka</i> <sup>D</sup> /+	14	73	5,2**	1,7 ± 1,0	5,9 × 10 <sup>-4</sup>
<i>horka</i> <sup>P</sup> /-	24	164	6,8**	1,9 ± 1,0	8,7 × 10 <sup>-4</sup>
Röntgensugárzás; 1000 Rad (150 kV; 0,5 mm Al; 500 Rad/perc)	12	119	9,9**	2,6 ± 1,5	1,7 × 10 <sup>-3</sup>
Kolhicin 1 µg/ml a táptalajban, 84-92 óras koruktól	4	63	15,8**	2,8 ± 1,5	2,9 × 10 <sup>-3</sup>
Etil-metánszulfonát 25 mM négy órán át, 84-92 óras korukban	18	57	3,2*	2,2 ± 1,4	4,6 × 10 <sup>-4</sup>
Formaldehid 0,05 M a táptalajban, 84-92 óras koruktól	46	136	2,9**	1,4 ± 0,7	2,8 × 10 <sup>-4</sup>

**Megjegyzések**

- Az adatok forrása a Szabad et al. 2012 dolgozat
- Átlag ± szórás
- \* és \*\*: a kontrolltól P<0,05, illetve P<0,01 szinten szignifikánsan különbözik.

**6. táblázat. Az *mwh*<sup>+Y</sup> kromoszóma vesztese benzol, egy parkettalakk és egy hígító hatására**

Kezelés	Szárny	<i>mwh</i>	A mozaik-	A mozaik- foltok	A mozaik foltok	
		mozaikfolt	gyakorisága	mérete	indukciójának	
	<i>N</i>	<i>n</i>	<i>n/N</i>	(sejt/folt)	gyakorisága	
				<i>m</i>	$f = n \cdot 2m/NC$	
Kontroll	64	259	4,0	1,17 ± 0,78	3,2 × 10 <sup>-4</sup>	
0,005	24 órán át	40	188	4,7	1,14 ± 0,74	3,6 × 10 <sup>-4</sup>
0,016		30	173	5,8	1,14 ± 0,71	4,4 × 10 <sup>-4</sup>
0,047		30	218	7,3*	1,18 ± 0,79	5,7 × 10 <sup>-4</sup>
0,140		12	107	8,9*	1,24 ± 0,85	7,4 × 10 <sup>-4</sup>
0,175		18	227	12,6**	1,22 ± 0,81	10,3 × 10 <sup>-4</sup>
0,175	1 órán át	38	176	4,6	1,18 ± 0,76	3,6 × 10 <sup>-4</sup>
	2 órán át	12	80	6,7	1,20 ± 0,79	5,3 × 10 <sup>-4</sup>
	4 órán át	20	236	11,8**	1,17 ± 0,76	9,2 × 10 <sup>-4</sup>
Parkett lakk (Supralux)	2 órán át	36	189	5,3	1,13 ± 0,74	4,0 × 10 <sup>-4</sup>
	6 órán át	40	188	4,7	1,14 ± 0,72	3,9 × 10 <sup>-4</sup>
	12 órán át	38	226	5,9	1,15 ± 0,75	4,6 × 10 <sup>-4</sup>
	24 órán át	28	216	7,7*	1,22 ± 0,81	6,3 × 10 <sup>-4</sup>
Hígító (H-100)	1 órán át	38	180	4,7	1,15 ± 0,80	3,6 × 10 <sup>-4</sup>
	2 órán át	40	202	5,1	1,15 ± 0,79	3,9 × 10 <sup>-4</sup>
	4 órán át	44	310	7,0*	1,19 ± 0,76	5,9 × 10 <sup>-4</sup>
	8 órán át	12	107	8,9*	1,19 ± 0,78	7,1 × 10 <sup>-4</sup>

**Megjegyzések**

- Az adatok forrása a Soós and Szabad 2014 dolgozat
- Átlag ± szórás
- \* és \*\*: a kontrolltól P<0,05, illetve P<0,01 szinten szignifikánsan különbözik.
- A benzol gőzének telítési koncentrációja 0,44 µg/ml, amit az a 95,1 Hgmm (25 °C) parciális nyomása alapján kiszámítható.



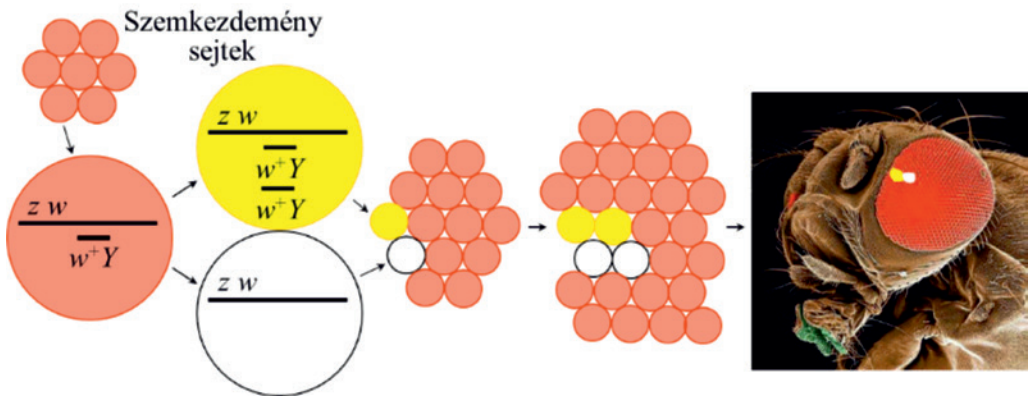
**74. ábra. Héjja Gyöngyi és Soós István a mutagén hatás tesztelésére alkalmas módszerek kidolgozásában vett részt.**

mechanizmusok evolúciósan erősen konzerváltak, amelyek a DNS épségének megőrzésén öröködnék, és azok is, amelyek a kromoszómák «igazságos» elosztására ügyelnek a leánysejtek között. Érthető, hogy a muslicával kapcsolatos eredmények nagy valószínűséggel érvényesek az emberre is. És természetesen nemcsak a magunk, hanem a velünk együtt élő fajok egészségét is óvnunk kell a különféle mutagén és egyben rákkeltő hatásoktól. Egy biztos: a muslicával és más modellfajokkal gyűjtött eredmények legalábbis figyelemkeltő értékűek.

Lényegében tehát a kutatásaink során felhalmozott ismereteink gyakorlati hasznosításaként olyan módszereket dolgoztunk ki, amelyek gyakorlati haszna nyilvánvaló. A SMART és a CLADS módszerek kidolgozásában Héjja Gyöngyi és Soós István volt társam (74. ábra). Pista a CLADS technikával kapcsolatos eredményei alapján érdemelte ki a PhD-fokozatot (Soós 2013).

### *Kromoszóma-„nyerés” és -vesztés*

Természetesen jó lenne, ha a különféle tanulmányozott hatások esetében nemcsak kromoszóma vesztést, hanem a „nyerést” is ki lehetne mutatni. És nemcsak az ivarsejtvoalban (Szabad 1986), hanem a testi sejtekben is. A réges-régi óhajt megvalósítandó dolgoztuk ki azt a módszert, amely lényege a következő (75. ábra; Szabad and Würgler 1987). Az X kromoszómához kapcsoltan öröklődő *white* (*w*) mutációt hordozó  $w/Y$  muslica hímek szeme fehér. (Valójában színtelen.) Ám a  $w/w^+Y$  hímek szeme téglapiros, mert hordozzák a  $w^+Y$  kromoszómát, benne a szem festékanyagok jelenlétéért felelős  $w^+$  gént. (Az  $w^+Y$  kromoszóma, amely hordozza az ép  $w^+$  gént, egy  $X \rightarrow Y$  transzlokáció nyomán képződött.) Ha mitotikus nondiszjunkció következik be a szemkezdemény sejtek valamelyikében, az egyik leánysejt „nyer” egy  $w^+Y$  kromoszómát, miközben a másik elveszti azt. Az egyik leánysejtben két  $w^+$  gén lesz, a másikban egy sem (75. ábra). Nos, ha az X kromoszóma hordozza a *zeste* (*z*) gén funkcióvesztéses allélját is, úgy a  $w/w^+Y/w^+Y$  sejt és utódsejtjei a *z* mutáció és a  $w^+$  gén két kópiája miatt sárgák lesznek (<http://flybase.org/>). Ugyanakkor a  $w^+Y$  kromoszómát nem tartalmazó  $w/0$  sejt és utódsejtjei fehérek. Vagyis a  $w/w^+Y$  vörös szemű hímek szemében képződő sárga foltok kromoszóma „nyerést”, a fehérek kromoszómavesztést jeleznek. Ha a különféle kezelések nyomán a kontrollnál gyakrabban képződnek sárga és/vagy fehér mozaik fol-



**75. ábra. Mitotikus nondiszjunkció nyomán sárga//fehér ikerfolt képződik a  $z w/w^+Y$  hímek szemében. A kép illusztráció. (Magyarázat s szövegben.)**

tok a  $z w/w^+Y$  hímek szemében, kijelenthetjük, hogy a tanulmányozott kezelésnek van kromozómainstabilizáló hatása (Szabad and Würzler 1987). Bár az itt felvázolt módszer nemcsak papíron, hanem a valóságban is „működik”, mégsem vonult be a rutinszerűen használt tesztek népes táborába. Két ok miatt nem. (i) Mivel a szem mozaik foltjainak és az ocellusok határa nem esik egybe, a kis mozaikfoltok nem, vagy csak bizonytalanul azonosíthatók. Azért, hogy a szem mozaikfoltjai nagyra növekedjenek, fiatal lárvákat kell kitenni a tanulmányozott hatásnak. Bennük viszont csak kevés célsejt van, ami miatt csökken a teszrendszer érzékenysége. (ii) A sárga foltok olyan halvány sárgák, hogy nem könnyű őket megkülönböztetni a fehérektől.

## Utószó

Mint minden műhelyé, a mienk ideje is kitelt. 2015. december 21-én meglepetés-összejövetelre invitált Erdélyi Miklós. Valóban nagy meglepetés volt: 15 olyan egykori munkatársunk jött el köszönteni nyugalomba vonulásom alkalmából, akik műhelyünkben dolgozva érdemelték ki tudományos fokozatot. A hosszú és kellemes este összegzése röviden így foglalható össze: bár sokat dolgoztunk, valójában játszottunk. A feleségem azzal toldotta meg a gondolatot, hogy a férje igazából egész életében játszott. Sok igazság van véleményében. Életem egyik nagy ajándéka, hogy olyasmivel, és olyan társakkal tölthetem/tölthetem életem, amiben és akikben kedvem letem/lelem.



**76. ábra. Tizenötven a műhelyünkben tudományos fokozatot kiérdemelték közül.**

Balról jobbra Villányi Zoltán, Mészáros Lídia, Gáspár Imre, Lippai Mónika, Ördög Balázs, Mihály József, Szikora Szilárd, Tirián László, Timinszky Gyula, Beleczt István, Szalontai Tamás, Héjja Gyöngyi, Soós István, Erdélyi Miklós és Hoffmann Gyula.

# Irodalom

- [1] Anderson KA, Jürgens G and Nüsslein-Volhard C, Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: genetic studies on the role of the *Toll* gene product. *Cell* 42:779-789, 1985.
- [2] Barth JMI, Szabad J, Hafen E and Köhler K, Autophagy in *Drosophila* ovaries is induced by starvation and is required for oogenesis. *Cell Death Differ* 18: 915-924, 2011.
- [3] Beleczi István, New cytoplasmic dynein functions in light of the *Drosophila Laborc<sup>D</sup>* mutation. *Ph.D. Thesis*. University of Szeged, Faculty of Medicine, Department of Biology, Szeged, 2001.
- [4] Beleczi I, Gonzalez C, Puro J and Szabad J, Dominant-negative mutant dynein allows spontaneous centrosome assembly, uncouples chromosome and centrosome cycles. *Curr Biol* 11: 136-140, 2001.
- [5] Brunner D, Oellers N, Szabad J, Biggs WH, Zipursky SA and Hafen E, A gain of function mutation in *Drosophila* MAP kinase activates multiple receptor tyrosine kinase signalling pathways. *Cell* 76: 1-20, 1994.
- [6] Bryant PJ, Cell lineage relationships in the imaginal wing disc of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* 22: 389-411, 1970.
- [7] Bryant PJ and Levinson P, Intrinsic growth control in the imaginal primordia of *Drosophila* and the autonomous action of a lethal mutation causing overgrowth. *Dev. Biol.* 107: 355-363, 1985.
- [8] Chou TB and Perrimon N, The autosomal FLP-DFS technique for generating germline mosaics in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 144: 1673-1679, 1996.
- [9] Clifford RJ and Schüpbach T, Coordinately and differentially mutable activities of torpedo, the *Drosophila melanogaster* homolog of the vertebrate EGF receptor gene. *Genetics* 123: 771-787, 1989.
- [10] Cumberledge S, Szabad J and Sakonju S, Gonad formation and development requires the abd-A domain of the bithorax complex in *Drosophila melanogaster*. *Development* 115: 395-402, 1992.
- [11] Ebert A, Schotta G, Lein S, Kubicek S, Krauss V, Jenuwein T and Reuter G, Su(var) genes regulate the balance between euchromatin and heterochromatin in *Drosophila*. *Genes Dev.* 18: 2973-2983, 2004.
- [12] Erdélyi M and Szabad J, Isolation and characterization of dominant female sterile mutations of *Drosophila melanogaster*. I. Mutations on the third chromosome. *Genetics* 122: 111-127, 1989.
- [13] Erdélyi M, Máthé E and Szabad J, Genetic and developmental analysis of mutant *Ketel* alleles that identify the *Drosophila* importin-b homologue. *Acta Biol. Hung* 48: 323-338, 1997.
- [14] Flaus A, Martin DM, Barton GJ and Owen-Hughes T, Identification of multiple distinct Snf2 subfamilies with conserved structural motifs. *Nucleic Acids Res.* 34: 2887-2905, 2006.
- [15] Galanopoulos VK, Orr W, Szabad J and Kafatos FC, Genetic analysis of chorion formation in *Drosophila melanogaster*. I. The effects of one somatic-specific and seven germ-line specific mutations. *Dev Gen.* 10: 87-97, 1989.
- [16] García-Bellido A and Merriam J, Genetic analysis of cell heredity in imaginal discs of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68: 2222-2226, 1971a.
- [17] García-Bellido A and Merriam JR, Parameters of the wing imaginal disc development of *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* 24: 61-87, 1971b.
- [18] García-Bellido A and Dapena J, Induction, detection of cell differentiation mutants in *Drosophila*. *Mol. Gen. Genet.* 128: 117-130, 1974.
- [19] Gáspár Imre és Szabad János, Sejtalkotók a kémiai Nobel-díj fényében; kivilágított fehérjék. *Élet és Tudomány* 83: 1478-1481, 2008.

- [20] Gáspár, Imre, The need for speed"; the role of  $\alpha$ 4-tubulin in adapting the spindle apparatus to the needs of early *Drosophila* embryogenesis. *Ph.D. Dissertation*. University of Szeged, 2008.
- [21] Gáspár I and Szabad J, *In vivo* analysis of MT-based vesicle transport by confocal reflection microscopy. *Cell Motil Cytoskeleton* 66: 68-79, 2009.
- [22] Gáspár I and Szabad J, Glu415 in the  $\alpha$ -tubulins plays a key role in stabilizing the microtubule-ADP-kinesin complexes. *J Cell Sci* 122: 2857-2865, 2009.
- [23] Gáspár I, Szikora S, Szalontai T and Szabad, Lodestar lodes the cohesin complexes onto the chromosomes in *Drosophila*. Manuscript in preparation.
- [24] Gepner J, Li MG, Ludmann S, Kortas C, Boylan K, Iyadurai SJP, Mcgrail M and Hays TS, Cytoplasmic dynein function is essential in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 142: 865-878, 1996.
- [25] Gerlitz G, Reiner O and Bustin M, Microtubule dynamics alter the interphase nucleus. *Cell Mol Life Sci*. 70: 1255-1268, 2013.
- [26] Giam M and Rancati G, Aneuploidy and chromosomal instability in cancer: a jackpot to chaos. *Cell Division*, 10.1186/s13008-015-0009-7, 2015.
- [27] Girdham CH and Glover DM, Chromosome tangling and breakage at anaphase result from mutations in *lodestar*, a *Drosophila* gene encoding a putative nucleoside triphosphate binding protein. *Genes Dev*. 5: 1786-1799, 1991.
- [28] Graf U, Würgler FE, Katz AJ, Frei H, Juon H, Hall CB, Kale PG, Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ Mutags* 6:153-188, 1984.
- [29] Handke B, Szabad J, Lidsky PV, Hafen E, Lehner CF, Towards long term cultivation of *Drosophila* wing imaginal discs *in vitro*. *PLoS ONE* 9(9): e107333, 2014.
- [30] Heuer JG, Li K and Kaufman TC, The *Drosophila* homeotic target gene *centrosomin*, *cnn*, encodes a novel centrosomal protein with leucine zippers and maps to a genomic region required for midgut morphogenesis. *Development* 121: 3861-3876, 1995.
- [31] Irish VF and Gelbart WM, The decapentaplegic gene is required for dorsal-ventral patterning of the *Drosophila* embryo. *Genes Dev*. 1: 868-879, 1987.
- [32] Januschke J, Gervais L, Gillet L, Keryer G, Bornens M and Guichet A, The centrosome nucleus complex directs the formation of two orthogonal microtubule polarized transport in the *Drosophila* oocyte. *Development* 133: 129-39, 2006.
- [33] Jeppsson K, Kanno T, Shirahige, K and Sjögren C, The maintenance of chromosome structure: positioning and functioning of SMC complexes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15: 601-614, 2014.
- [34] Kiss I, Bencze G, Fodor A, Szabad J and Fristrom JW, Pupal-larval mosaics in *Drosophila melanogaster*. *Nature* 262: 136-138, 1976.
- [35] Klingler M, Erdélyi M, Szabad J and Nüsslein-Volhard C, The role of *torso* in determining the terminal Anlagen of the *Drosophila* embryo. *Nature* 335: 275-277, 1988.
- [36] Komitopoulou K, Gans M, Margaritis LM, Kafatos FC and Masson M, Isolation and characterization of sex-linked female-sterile mutants in *Drosophila melanogaster* with special attention to eggshell mutants. *Genetics* 105: 897-920, 1983.
- [37] Kristó Gy, Makk F és Szegfű L, Adatok „korai” helyneveink ismeretéhez. I. *Acta Universitatis Szegediensis de Attila József Nominatae, Acta Historica* 44: 1-96, 1973.
- [38] Kristó Gy, Makk F és Szegfű L, Adatok „korai” helyneveink ismeretéhez. II. *Acta Universitatis Szegediensis de Attila József Nominatae, Acta Historica*, 48: 1-55, 1974.
- [39] Kuhfittig S, Szabad J, Schotta G, Hoffmann J, Máthé E and Reuter G, *pitkin<sup>D</sup>*, a novel gain-of-function enhancer of position-effect-variegation, affects chromatin regulation during oogenesis and early embryogenesis in *Drosophila*. *Genetics* 157: 1227-1244, 2001.
- [40] Lamnissou K and Galanopoulos B, The somatic line dominant female sterile mutant *Fs(2)Ugra* affects egg maturation in *Drosophila melanogaster*. *Hereditas* 132:161-164, 2000.
- [41] Lippai, Mónika, The *Ketel* gene encodes a *Drosophila* Importin-b homologue. *Ph.D. Thesis*. Albert Szent-Györgyi Medical University, Department of Biology, Szeged, 1999



- [42] Lippai M, Tirián L, Boros I, Mihály J, Erdélyi M, Beleczi I, Máthé E, Pósfai J, Nagy A, Udvardy A, Paraskeva E, Görlich D and Szabad J, The *Ketel* gene encodes a Drosophila homologue of Importin- $\beta$ . *Genetics* 156: 1889-1900, 2000.
- [43] Liu S and Jack J, Regulatory interactions and role in cell type specification of the Malpighian tubules by the *cut*, *Kruppel*, and *caudal* genes of Drosophila. *Dev. Biol.* 150: 133-143, 1992.
- [44] Lombardot B, Oh CT, Kwak J, Genovesio A, Kang M, Hansen MAE and Han, SJ, High-throughput *in vivo* genotoxicity testing: an automated readout system for the somatic mutation and recombination test (SMART). *PLoS ONE*, 10(4): e0121287. <http://doi.org/10.1371>, 2015.
- [45] Loppin B, Dubruielle R and Horard B, The intimate genetics of Drosophila fertilization. *Open Biology* 5: 150076, <http://dx.doi.org/10.1098/rsob.150076>, 2015.
- [46] Mahone M, Saffman EE and Lasko PF, Localized Bicaudal-C RNA encodes a protein containing a KH domain, the RNA binding motif of FMR1. *EMBO J.* 14: 2043-2055, 1995.
- [47] Marcos R and Carmona ER, The wing-spot and the comet tests as useful assays detecting genotoxicity in Drosophila. In: *Methods in Molecular Biology*, Springer, Vol. 1044, pp: 414-427, 2013.
- [48] Marcos R, Sierra LM and Gaivao I, The SMART Assays of Drosophila: Wings and Eyes as Target Tissues. In: *Methods in Pharmacology and Toxicology*, Springer, pp: 283-295, 2014.
- [49] Máthé, Endre, Female meiosis and the onset of embryogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Ph.D. Thesis*, Albert Szent-Györgyi Medical University, Szeged, 1996.
- [50] Máthé E, Boros I, Jószyk K, Li K, Puro J, Kaufman TC and Szabad J, The *Tomaj* mutant alleles of  *$\alpha$ Tubulin67C* reveal a requirement for the encoded maternal specific tubulin isoform in the sperm aster, the cleavage spindle apparatus and neurogenesis during embryonic development in Drosophila. *J Cell Sci* 111: 887-896, 1998.
- [51] Matthews KA, Rees D and Kaufman TC, A functionally specialized  $\alpha$ -tubulin is required for oocyte meiosis and cleavage mitoses in Drosophila. *Development* 117: 977-991, 1993.
- [52] McPherson AJ, Lange A, Doetsch PW and Corbett AH, *Nuclear-Cytoplasmic Transport*. In: eLS. John Wiley & Sons Ltd, Chichester. <http://www.els.net> [doi: 10.1002/9780470015902.a0001351.pub3], 2015.
- [53] Peters JM, The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nature Reviews Mol Cell Biol* 7: 644-656, 2006.
- [54] Pomiankowski A, Nöhiger R and Wilkins A, The evolution of the Drosophila sex-determination pathway. *Genetics* 166: 1761-1773, 2004.
- [55] Robinson JT, Wojcik EJ, Sanders MA, McGrail M, Hays TS: Cytoplasmic dynein is required for the nuclear attachment and migration of centrosomes during mitosis in Drosophila. *J Cell Biol* 146: 597-608, 1999.
- [56] Ruiz MF, Alvarez M, Eirín-López JM, Sarno F, Kremer L, Barbero JL, Sánchez L, An Unusual Role for doublesex in Sex Determination in the Dipteran *Sciara*. *Genetics* 200: 1181-1199, 2015.
- [57] Salz HK, Sex determination in insects: a binary decision based on alternative splicing. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 21: 395-400, 2011.
- [58] Sapir A, Schweitzer R, Shilo BZ, Sequential activation of the EGF receptor pathway during Drosophila oogenesis establishes the dorsoventral axis. *Development* 125: 191-200, 1998.
- [59] Sharp DJ, Brown HM, Kwon M, Rogers GC, Holland G and Scholey JM, Functional coordination of three mitotic motors in Drosophila embryos. *Mol Biol Cell* 11: 241-253, 2000.
- [60] Soós, István, Vapors of benzene, a parquet varnish and a synthetic thinner induce chromosome loss in cells of the Drosophila wing primordia *Ph.D. Thesis*. University of Szeged, Faculty of Medicine, Department of Biology, Szeged, 2013.
- [61] Soós István - Szabad János, Kromoszómáink stabilitása. *Természet Világa* pp: 143: 386-389, 2012.
- [62] Soós I and Szabad J, Assaying benzene, a parquet varnish, and a synthetic thinner for inducing *in vivo* chromosome loss in Drosophila wing primordia cells. *Mutat Res Genet Toxicol Environ-Mutagen* 763: 18-22, 2014.

- [63] Stewart M, Molecular mechanism of the nuclear protein import cycle. *NatRev MolCell Bioly* 8: 195-208, 2007.
- [64] Surján A, Kocsis Z, Csik M, Pintér A, Török G, Börzsönyi M and Szabad J, Analysis of the genotoxic activity of four N-nitroso compounds by the *Drosophila* mosaic test. *Muta Resh Let* 144: 177-181, 1985.
- [65] Szabad J, A genetic assay for the detection of aneuploidy in the germ-line cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research* 164: 305-326, 1986.
- [66] Szabad J, Genetic requirement of epidermal and female germ line cells in *Drosophila* in the light of clonal analysis. *Int. J. Dev. Biol.* 42: 257-262, 1998.
- [67] Szabad J, A mutagenitás alapjai. In: *Mezőgazdasági ökotoxikológia* (szerk: Darvas B, Székács A), L'Harmattan, Budapest, pp: 143-157, 2006a.
- [68] Szabad J, A daganatképződés molekuláris biológiája. In: *Mezőgazdasági ökotoxikológia* (szerk: Darvas B, Székács A), L'Harmattan, Budapest, pp: 170-178, 2006b.
- [69] Szabad János, Muslica - egy százéves modell. In: *Sejtbiológia* (szerk: Szabó G), 2. kiadás, Medicina, Budapest, pp: 768-779, 2009.
- [70] Szabad J and Bryant PJ, The mode of action of „discless” mutations of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* 93: 240-256, 1982.
- [71] Szabad J and Fajsi C, Control of female reproduction in *Drosophila*: genetic dissection using gynandromorphs. *Genetics* 100: 61-78, 1982.
- [72] Szabad J and Bennettová B, Analysis of the genotoxic activity of five components affecting insect fertility. *Mutat Res* 173: 197-200, 1986.
- [73] Szabad J and Würgler FE, A genetic assay to detect chromosome gain and/or loss in somatic cells of *Drosophila*. *Mutation Research* 180: 201-206, 1987.
- [74] Szabad J and Hoffmann Gy, Analysis of follicle cell functions in *Drosophila*: the *Fs(3)Apc* mutation and the development of chorionic appendages. *Dev. Biol.* 131: 1-10, 1989.
- [75] Szabad J and Nöthiger R, Gynandromorphs of *Drosophila* suggest one common primordium for the somatic cells of the female and male gonads in the region of abdominal segments 4 and 5. *Development* 115: 527-533, 1992.
- [76] Szabad J, Simpson P and Nöthiger R, Regeneration and compartments in *Drosophila*. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 49: 229-241, 1979.
- [77] Szabad J, Schüpbach T and Wieschaus E, Cell lineage and development of the larval epidermis in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* 73: 256-271, 1979.
- [78] Szabad J, Máthé E and Puro J, *Horka*, a dominant mutation of *Drosophila*, induces nondisjunction and, through paternal effect, chromosome loss and genetic mosaics. *Genetics* 139: 1585-1599, 1995.
- [79] Szabad J, Erdélyi M and Szidonya J, Characterization of *Fs(2)1*, a germ-line dependent dominant female sterile mutation of *Drosophila*. *Acta BiolHung* 38: 257-266, 1987.
- [80] Szabad J, Reuter G and Schröder MB, The effect of two mutations - connected with chromatin functions - on female germ-line cells of *Drosophila*. *Mol Gen Gen* 211: 56-62, 1988.
- [81] Szabad J, Jursnich VA and Bryant PJ, Requirement for cell proliferation control genes in *Drosophila* oogenesis. *Genetics* 127: 525-533, 1991.
- [82] Szabad J, Bellen HJ and Venken KJT, An assay to detect *in vivo* Y chromosome loss in *Drosophila* wing disc cells. ***Genes, Genomes, Genetics* 2: 1095-1102, 2012.**
- [83] Szabad J, Soós I, Polgár G and Héjja G, Testing the mutagenicity of malondialdehyde and formaldehyde by the *Drosophila* mosaic and the sex-linked recessive lethal tests. *Mutat Res* 113: 117-133, 1983.
- [85] Szabad J, Erdélyi M, Hoffmann Gy, Szidonya J and Wright TRF, Isolation and characterization of dominant female sterile mutations of *Drosophila melanogaster*. II. Mutations on the second chromosome. *Genetics* 122: 823-835, 1989.

- [86] Szalontai, Tamás, *Horka<sup>D</sup>*, a chromosome instability causing mutation in *Drosophila*, identifies the *Iodestar* gene and indicates involvement of the LDS protein in metaphase chromatin surveillance. *Ph.D. Dissertation*. University of Szeged, 2008.
- [87] Szalontai T, Gáspár I, Beleczi I, Kerekes I, Erdelyi M, Boros I and Szabad J, *Horka<sup>D</sup>*, a chromosome instability-causing mutation in *Drosophila*, is a dominant-negative allele of *Iodestar*. *Genetics* 181: 367-377, 2009.
- [88] Szilárd, Szikora, Poking microtubules bring about nuclear wriggling to position nuclei. *Ph.D. Thesis*. University of Szeged, Szeged, 2012.
- [89] Szikora Szilárd, Gáspár Imre, Szabad János, Hogyan kerülnek helyükre a sejtmagok? *Természet Világa* 141: 303-306, 2010.
- [90] Szikora S, Gáspár I and Szabad J, Poking microtubules bring about nuclear wriggling to position nuclei. *J Cell Sci* 126: 254-262, 2013.
- [91] Taubert H and Szabad J, Genetic control of cell proliferation in female germ-line cells of *Drosophila*: mosaic analysis of five „discless” mutations. *Mol Genl Genet* 209: 545-551, 1987.
- [92] Thomä NH, Czyzewski BK, Alexeev AA, Mazin AV, Kowalczykowski SC and Pavletich NP, Structure of the SWI2/SNF2 chromatin-remodeling domain of eukaryotic Rad54. *Nat Struct. Mol. Biol.* 12: 350-356, 2005.
- [93] Timinszky, Gyula, The role of importin- $\beta$  in nuclear envelope assembly. *Ph.D. Thesis*. The University of Szeged, Faculty of Medicine, Department of Biology, Szeged, 2003.
- [94] Timinszky G, Tirián L, Nagy FT, Tóth G, Perczel A, Kiss-László Z, Boros I, Clarke PR and Szabad J, The Importin- $\beta$  P446L dominant negative mutant protein loses RanGTP binding ability and blocks the formation of intact nuclear envelope. *J. Cell Sci* 115: 1675-1687, 2002.
- [95] Tirián, László, Developmental and molecular genetics of *Ketel*, the *Drosophila* homologue of Importin-b. *Ph.D. Thesis*. The University of Szeged, Faculty of Medicine, Department of Biology, Szeged, 2001.
- [96] Tirián László, Lippai Mónika és Szabad János, Ran, dzsoli dzsóker a sejtekben. *Biokémia* 15: 1-8, 2001.
- [97] Tirián L, Timinszky G and Szabad J, P446L-importin-b inhibits nuclear envelope assembly by sequestering nuclear envelope assembly factors to the microtubules. *Eur JCell Sci* 82: 351-359, 2003.
- [98] Tirián L, Puro J, Erdélyi M, Boros I, Papp B, Lippai M and Szabad J, The *Ketel<sup>D</sup>* dominant-negative mutations identify maternal function of the *Drosophila* Importin-b gene required for cleavage nuclei formation. *Genetics* 156: 1901-1912, 2000.
- [99] Vakifahmetoglu, H, Olsson M and Zhivotovsky B, Death through a tragedy: mitotic catastrophe. *Cell Death Differ* 15: 1153-1162, 2008.
- [100] Venkei, Zsolt,  $\alpha$ 4-tubulin is essential for rapid formation of long interpolar microtubules to push apart the daughter centrosomes along the nuclear perimeter during early *Drosophila* embryogenesis. *Ph.D. Dissertation*. University of Szeged, 2006
- [101] Venkei Z and Szabad J, The *Kavar<sup>D</sup>* dominant female-sterile mutations of *Drosophila* reveal role of the maternally provided  $\alpha$ 4-tubulin isoform in cleavage spindle maintenance and elongation. *Mol Genetd Genomics* 273: 283-289, 2005.
- [102] Venkei Z, Gáspár I, Tóth G and Szabad J,  $\alpha$ 4-Tubulin is involved in rapid formation of long microtubules to push apart the daughter centrosomes during early *Drosophila* embryogenesis. *J. Cell Sci* 119, 3238-3248, 2006.
- [103] Villányi, Zoltán, How is expression of the importin- $\beta$  encoding *Ketel* gene of *Drosophila* regulated? *Ph.D. Dissertation*. University of Szeged, 2008.
- [104] Villányi Z, Debec A, Timinszky G, Tirián L and Szabad J, Long persistence of importin- $\beta$  explains extended survival of cells and zygotes that lack the encoding gene. *Mech Dev* 125: 196-206, 2008a.

- [105] Villányi Z., Papp B, Szikora S, Boros I and Szabad J, The DRE motif is a key component in the expression regulation of the importin- $\beta$  encoding *Ketel* gene in *Drosophila*. *Mech Dev* 125: 822-831, 2008b.
- [106] Villányi Z, Gáspár I, Szikora S, Puskás GL and Szabad J, Importin- $\beta$  and peroxiredoxin-6005 are involved in mitochondrial biogenesis. *Mech Dev* 128: 191-199, 2011.
- [107] Vitale I, Galluzzi L, Castedo M and Kroemer G, Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability. *Nature Reviews MolCell Biol*12: 385-392, 2011.
- [108] Wieschaus E, A combined genetic and mosaic approach to the study of oogenesis in *Drosophila*. In: *Development and Neurobiology of Drosophila* (eds:Siddiqi O, Babu P, Hall LM and Hall JC), Plenum Press, New York, pp: 85-94, 1980.
- [109] Wieschaus E and Szabad J, The development and function of the female germ line in *Drosophila*: a cell lineage study. *Dev. Biol.* 68: 29-46, 1979
- [110] Yarger RJ and King RC, The phenogenetics of a temperature sensitive, autosomal dominant, female sterile gene in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* 24: 166-177, 1971.
- [111] Zhang C and Clarke PR, Roles of Ran-GTP and Ran-GDP in precursor vesicle recruitment and fusion during nuclear envelope assembly in a human cell-free system. *Curr. Biol.* 11, 208-212, 2001.
- [112] Zhao T, Graham OS, Raposo A, St Johnston D. Growing microtubules push the oocyte nucleus to polarize the *Drosophila* dorsal-ventral axis. *Science* 336: 999-1003, 2012.