

GENOM SZERVEZŐDÉS DROSOPHILA MELANOGASTERBEN

GAUSZ JÁNOS

MTA Szegedi Biológiai Központ, Genetikai Intézet, Szeged

Az utóbbi években a molekuláris biológiai kutatások jelentős része a valódi sejtmaggal rendelkező eukarióta szervezetek génszerkezetének megismerését szolgálta. A baktériumok és vírusok, tehát a prokaryoták genetikai szerveződése elég jól ismert, de ezeken az organizmusokon kapott eredmények nem alkalmazhatók közvetlenül az eukariótákra, mivel ezek a szervezetek genetikailag sokkal bonyolultabbak és géneik működését is eltérő molekuláris mechanizmusok szabályozzák.

Mivel az eukarióták (növények, állatok) kromoszómáin egy időpontban sok gén működik, célszerű ezek közül csak néhányat kiválasztani és ezek szerkezetét vizsgálni. Ilyen jellegű vizsgálatokra csak olyan fajok alkalmasak, amelyek genetikája jól ismert. Ezért választottuk vizsgálati objektumként az ecetmuslicát vagy másként a *Drosophila melanogaster*t. Genetikailag előnyös tulajdonságai közül csak az alacsony kromoszómaszámot ($n = 4$) és a rövid generációs időt (10 nap), valamint a könnyű laboratóriumi tenyésztethetőséget kell megemlíteni.

A *Drosophila* lárvák nyálmirigysejtjeiben óriáskromoszómák alakulnak ki. Ezekben a diploid sejtek kromoszómáihoz képest ezerszeres DNS mennyiség található, így a kromoszómák finomabb szakaszai is jól láthatók és analizálhatók (1. ábra). Jól megfigyelhető, hogy a kromoszómán vékonyabb, vastagabb sávok következnek egymás után. Valószínű, hogy ezek mindegyikéhez csak egy tulajdonságot kódoló gén tartozik (JUDD és mtsai 1972). A sávok morfológiailag eltérőek és mintázatuk állandó, így az egyes gének helyzete az óriáskromoszómán jól meghatározható. Minden egyes sávot egy három tagú kódszámmal jelölünk (pl. 87A7 stb.). A nyálmirigy kromoszómákon nemcsak az egyes géneket lehet azonosítani, hanem az esetek egy részében ezek működése is megfigyelhető. Ezekben a helyeken a DNS erősen fellazul és jellegzetes duzzanatok, ún. „puffok” keletkeznek (1. ábra). Ezek helyzete és mérete jellemző a fajra, ill. a fejlődési stádiumra is. Ez egyúttal azt is jelzi, hogy az egyedfejlődés folyamán a gének egy része differenciáltan működik (BEERMANN 1972).

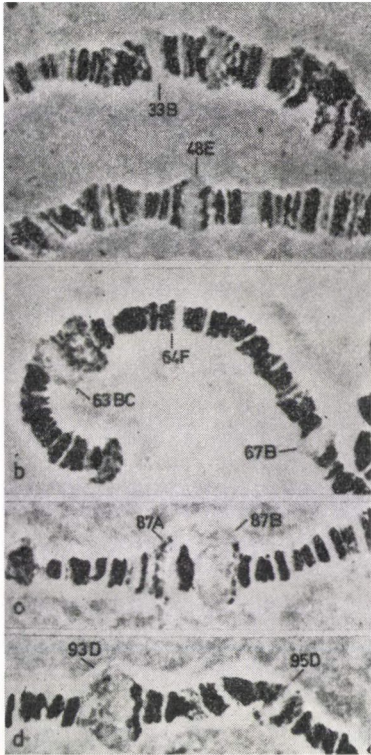
Bizonyos *Drosophila* gének működését egyszerű mesterséges beavatkozással is kiválthatjuk. Ha a lárvákat rövid ideig 37°C hőmérsékletre helyezzük,

majd az izolált nyálmirigyek kromoszómáit megvizsgáljuk, 9 specifikus helyen puffok figyelhetők meg, tehát 9 új gén kapcsolódott be (RITROSSA 1962, ASH-BURNER 1970). Mivel az új puffokat hővel indukáltuk, hő-sokk puffoknak nevezzük őket. Az új gének bekapcsolásával egyidejűleg a legtöbb addig meglévő puff visszafejlődik, vagyis a legtöbb addig működő gén „kikapcsol”. Ezzel egyidejűleg biokémiai kimutatható változások is lejátszódnak. A hőkezelés 6–8 új mRNS és azonos számú protein nagy mennyiségű szintézisét váltja ki (TISSIÉRES és mtsai 1974), míg az addig képződő sokféle mRNS és protein szintézise megszűnik, ill. visszaszorul (MCKENZIE és mtsai 1975, SPRADLING és mtsai 1977). Fontos megemlíteni, hogy a génműködés citológiai csak a nyálmirigysejtekben mutatható ki, viszont a keletkező RNSEk és fehérjék szintézisét minden megvizsgált szövettípusban észlelték. Így joggal feltételezhető, hogy a magas hőmérséklet minden szövetben ugyanazon gének működését indukálja. Ezeket a géneket alkalmasnak találtuk arra, hogy a gén és a róla képződő mRNS, ill. az arról lefordított protein közötti gén—termék viszonyt analizáljuk.

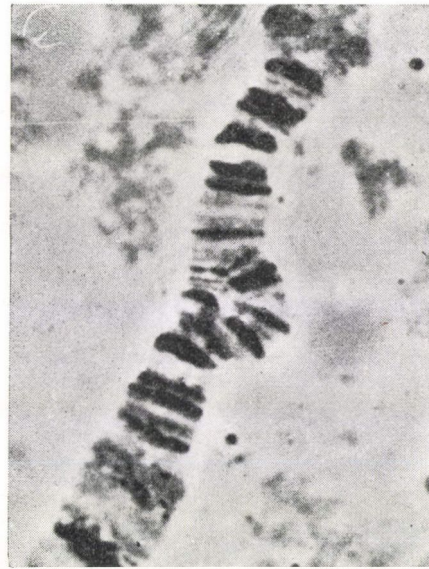
Amikor 1976-ban elkezdjük vizsgálatainkat, a hő-sokk jelenség biokémiájáról már sok adat gyűlt össze, keveset tudtunk azonban a hő-sokk proteinek kódolásáért felelős génekről. Ezért célul tűztük ki, hogy ezen gének közül néhányat genetikai módszerekkel analizáljunk. Egy gén szerkezetét, ill. működését ugyanis csak akkor tudjuk megérteni, ha ezt a gént mutációval „elrontjuk” és a működésképtelen mutáns szerkezetét összehasonlítjuk a funkcionális vagy más szóval vad típusú génnel. Természetesen nem mertük volna ezt a megközelítést választani, ha nem számíthattunk volna biokémikus kollégáink segítségére, mivel ilyen típusú analízist csakis komplex interdiszciplináris kutatás keretében (biokémikusok és genetikusok együttműködésével) lehet végrehajtani.

A hővel indukálható hő-sokk puffok közül 9-et sikerült eddig azonosítani, mi ezek közül kettőt (a 87A és 87C kódjelűeket) választottuk ki, mivel egymáshoz közel helyezkednek el és így együttes vizsgálatukhoz nem kellett külön genetikai rendszert kifejleszteni.

A genetikai kísérletekben először azt a célt tűztük ki, hogy a két hő-sokk puff képződéséért felelős géneket eltávolítsuk a kromoszómáról. Ezt elvben legegyszerűbben deléciós kromoszómák előállításával érhetjük el. Ennek érdekében kifejlett imágókat Röntgen sugárzással kezeltünk, hogy kromoszóma töréseket idézzünk elő. Így olyan deléciós kromoszómákat hoztunk létre, amelyekből a puffok képződéséért felelős gének hiányoztak (2. ábra). A nyálmirigy kromoszómák esetében a diploid szervezetekre jellemző apai, ill. anyai eredetű homológ kromoszómák úgy párosodnak egymással, hogy a két kromoszóma egynek tűnik. Deléciós törzsekben az egyik kromoszóma-szárról egy géncsoport hiányzik, míg a másik sértetlen, a hiányzó szekvenciákkal szemkölti rész egy hurkot képez. A sávok jellegzetes morfológiája alapján az is



1. ábra. *Drosophila melanogaster* nyálmirigy óriáskromoszómák hő-indukált puffjai (ASHBURNER 1970)



2. ábra. *Df*/3R/karr1W/TM3 deléziós nyálmirigy kromoszóma citológiai képe. A kontroll kromoszóma szál hurkot képez

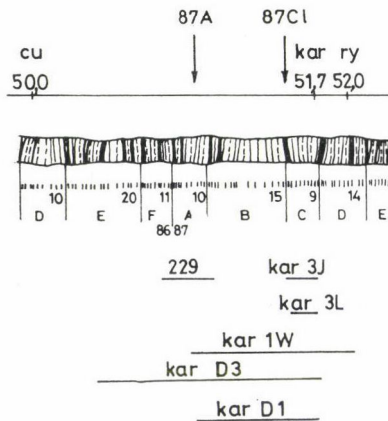
meghatározható, hogy egy deléziós törzsben pontosan milyen gének hiányoznak. Megfelelő szelektációs rendszerrel sok különböző méretű deléziós kromoszómát szelektálva olyan törzseket állítottunk elő, amelyekből a deléciók különböző géneket távolítottak el (ISH-HOROWICZ és mtsai 1979 a, GAUSZ és mtsai 1979). Mivel a hő-sokk gének esetében a gén aktív állapota is jól látható puff formájában, egy olyan deléziós kromoszómán, amelyen hő-sokk puff nem indukálható, az annak képződéséért felelős génnek hiányoznia kell (3. ábra).

A 3a. ábrán jól látható, a két hő-sokk puff képződése az egyik szálon, míg a másikon csak a 87C puff látható, tehát a 87A képződéséért felelős gén hiányzik. A 3b. ábrán viszont a deléziós szálról a 87C puff képződéséért felelős gének hiányoznak. A 3c. ábra pedig olyan deléciót mutat, amelyben mindkét hő-sokk puff képződéséért felelős gének hiányoznak. A különböző deléziós törzsek segítségével így lehetségessé vált, hogy a hő-sokk puff képződéséért felelős sávokat — tehát a géneket — azonosítsuk. Így, ma már tudjuk, hogy ezek a 87A7, ill. 87C1 sávokban találhatóak.



3. ábra. Hőkezelt lárvák nyálmirigy kromoszómáinak citológiai képe. a) 87A puffot eltávolító, deléció, *Df/3R/229*, b) 87C puffot eltávolító deléció, *Df/3R/kar^{3J}*, c) mindkét hő-sokk puffot eltávolító deléció *Df/3R/229 Df/3R/kar^{3J}*. A nyíl a hiányzó puff helyét jelöli, a háromszög a kontroll kromoszóma 2 hő indukált puffja között helyezkedik el

Szerettük volna megállapítani, hogy ez a két hő-sokk puff milyen hő-sokk proteinek kódolásáért felelős. Ezekhez a vizsgálatokhoz is deléciós törzseket használtunk (4. ábra).



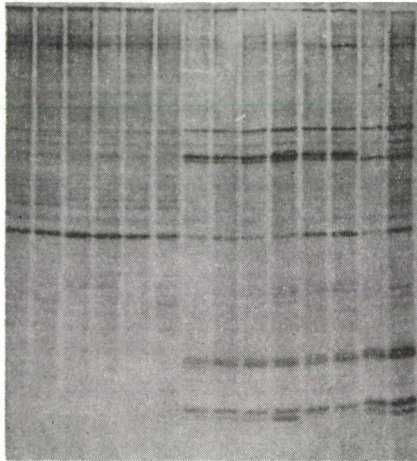
4. ábra. A hő-sokk proteinek analizéséhez felhasznált deléciók citológiai kiterjedése

A 229 jelű törzsből csak a 87A hő-sokk puff, a *kar^{3J}* jelűből csak a 87C hő-sokk puff, míg a *kar^{1W}* jelűből mindkettő hiányzott. Erre a célra azonban olyan deléciós állatokat kellett használni, amelyekben mindkét kromoszóma-homológáról hiányoztak a puff-képződéséért felelős gének. Ilyen embriókat választottunk ki és a hőkezelés előtt, ill. után proteinjeiket elektroforézist követő autoradiográfiával vizsgáltuk (5. ábra).

Jól megfigyelhető, hogy hőkezelés nélkül mindegyik deléciós törzsben azonos a protein-mintázat. Ugyanakkor az is látszik, hogy a hőkezelt állatokban gyakorlatilag csak hő-sokk proteinek képződnek. Azonos hő-sokk proteinek találhatóak a vad típusú, valamint a 87A, ill. a 87C puff-hiányos törzsekben. Az egyetlen eltérést az utolsó két oszlopban látjuk (5m és 5n ábra), egyetlen protein hiányzik azokból az állatokból, ahol mindkét (a 87A és a 87C) hő-sokk gén hiányzik. Ez a protein kb. 70 000 dalton mólusúlyú, így ezt 70 hsp-nek nevezzük. Ebből a kísérletből az is következik, hogy mind a 87A, mind a 87C hő-sokk puff azonos proteint kódol, és a két gén bármelyikének a hiányát a meglévő másik képes működéssel ellensúlyozni (ISH-HOROVICZ és mtsai 1979a).

A genetikus törekvése arra irányul, hogy az általa vizsgált gén működését mutációval megakadályozza és az új mutáns fenotípusból következtessen az eredeti funkcióra. Ez esetünkben nem látszott könnyű feladatnak. Első

a b c d e f g h i j k l m n



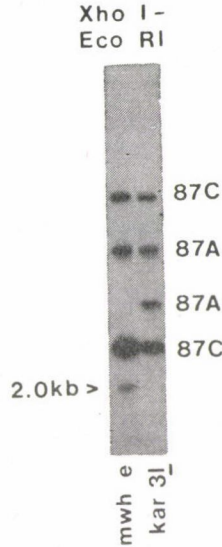
5. ábra. Hőindukált protein szintézis embriókban, amelyekből az egyik vagy mindkét 87 hő-indukált puff képződéséért felelős gének hiányoznak. Egyedi embriókat 25 percig inkubáltunk 22°, ill. 36 °C hőmérsékleten és S³⁵-metioninnal jelöltük őket 30 percig 25 °C hőmérsékleten. A proteineket extraháltuk, majd 11%-os SDS-akrilamid gélen szeparáltuk és autoradiográfiával tettük láthatóvá. Nem hőkezelt: (a és b) *Df/3R/229*, (c és d) *Df/3R/*kar^{3J}** (e és f) *Df/3R/229 Df/3R/*kar^{3J}** embriók. Hőkezelt: (g és h) vad típusú (i és j) *Df/3R/229*, (k és l) *Df/3R/*kar^{3J}**, (mn és n) *Df/3R/229 Df/3R/*kar^{3J}** embriók. A nyíl mutatja a 70 hsp helyét a gélen



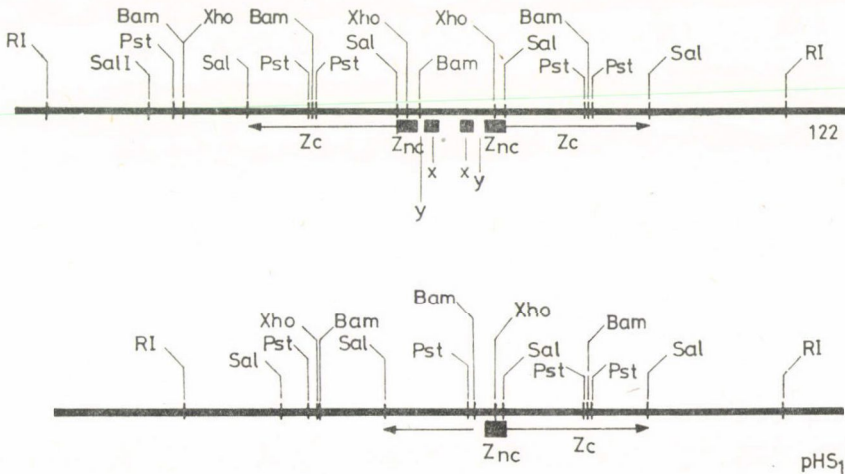
6. ábra. Mutáns törzs (*muche*) hőindukált 87A és 87C puff képződése 37 °C hőkezelés után. A nyíl mutatja a kontrollhoz képest kisebb méretű 87A puffot

eredményeink kissé kiábrándítóak voltak, mivel nagyon nehéz egy olyan gén mutációs változását kimutatni, amelyből több példány is van a haploid genomban. Munkánkkal egyidőben más, külföldi laboratóriumokban a 70 hsp-t kódoló géneket sikeresen izolálták génszabványos módszerekkel (SCHEDL és mtsai 1978, CRAIG és mtsai 1979) és szerkezetüket analizálva megerősítették, hogy a 87A és a 87C puffok a 70 hsp-t kódolják. Behizonyították továbbá, hogy a 87A helyen legalább kettő, míg a 87C helyen legalább három 70 hsp-kódoló gén található (HOLMGREN és mtsai 1979, ISH-HOROWICZ és mtsai 1979b). Mivel a 70 hsp gének száma néhány esetben variációt mutatott (MIRAULT és mtsai 1979), arra gondoltunk, hogy talán olyan állatok is előfordulnak, amelyekben a 70 hsp gének esetleg kevesebb példányban vannak jelen. Feltételeztük, hogy a 70 hsp struktúrgének számának csökkenésével arányosan csökkent mértékű gén-aktivitás kisebb hő-sokk puff mérettel jellemezhető. Sok különböző eredetű laboratóriumi törzset vizsgáltunk át és végül sikerült is egy olyan törzset találni, amelyben kisebb méretű hő-sokk puff képződött a 87A kromoszómális helyen (6. ábra).

Ez a csökkent génműködés feltételezésünk szerint egy spontán mutáció eredménye. Ilyen mutáció természetesen többféle okból is létrejehet, bár a következő két lehetőség tűnt a legvalószínűbbnek: (1) a kisebb génaktivitást okozhatja a 2 struktúrgén egyikének hiánya, vagy (2) mindkettő megvan, de aktivitásuk kisebb. Ezen lehetőségek között csak úgy tudtunk különbséget tenni, hogy meghatároztuk a mutáns törzsben a 70 hsp gének számát.



7. ábra. 70 hsp gének számának meghatározása mutáns (*mwh e*) és kontroll (*kar^{3J}*) törzsben. XhoI és EcoRI restriktions enzimekkel emésztett DNS-t agaróz gélen különítették el és a 70 hsp géneket az 56H8 klónozott hősokk génből származó radioaktív próbával mutattuk ki. A nyíl jelzi, hogy a mutáns törzsből származó egyik 87A gén helyett egy kisebb méretű (2,0 kb.) fragmentum található



8. ábra. A mutáns (pHS1) és vad típusú (122) plazmidokban izolált 87A specifikus 70 hsp gének fizikai térképének összehasonlítása. A nyíllal jelölt szakasz a 70 hsp struktúrgént jelzi (Zc), míg a Znc, x és y jelű szakaszok a 70 hsp struktúrgének közötti egyéb DNS szekvenciákat jelölik, amelyek valószínűleg a transzkripció regulációjában jelentősek. Az RI, Bam, Pst, Xho és Sal pedig egyes restriktio enzim hasítási helyeket jelölnék. Jól megfigyelhető, hogy a pHS1 mutáns törzsből származó 70 hsp gének egyike rövidebb és a 2 struktúrgén közötti DNS szekvenciák is hiányoznak

A mutáns törzsből (*mwhe*) DNS-t izoláltunk és megfelelő módszerekkel agaróz gélen autoradiográfiával elkülönítettük az egyedi 70 hsp struktúrgéneket különböző méretű DNS-darabok formájában (7. ábra).

A kontroll törzsből (*kar^{3L}*) jól látható 4 eltérő DNS darab, amely valójában 5 70 hsp gént mutat. A mutánsból származó (*mwhe*) DNS-ben az egyik gén helyett egy sokkal kisebb méretű DNS darab található. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a spontán mutáció eredményeként a 87A-ban található 2 gén egyike részben elveszett. A továbbiakban ezt a hibás szerkezetű gént szerettük volna részletesen megvizsgálni és összehasonlítani a működőképes génnel.

Génebézési technikák alkalmazásával izoláltuk a mutáns törzsből származó 87A 70 hsp géneket és az izolált klón (pHSL) fizikai térképét összehasonlítottuk egy vad típusú gén (122) már ismert szerveződésével (GOLDSCHMIDT-CLERMONT 1980). Az eredmények azt mutatják, hogy a mutáns törzsből az egyik 70 hsp struktúrgén sokkal rövidebb (8. ábra), és ez magyarázhatja a nyálmirigy kromoszómákon megfigyelt kisebb génaktivitást. További vizsgálatainkban részleteiben is sikerült bizonyítani, hogy a hibás génről nem történik transzkripció és így transláció sem (UDVARDY és mtsai 1981).

Összefoglalás

Genetikai és biokémiai módszerek alkalmazásával olyan *Drosophila* géneket analizáltunk, amelyek hőkezeléssel aktiválhatók. Ezek közül kettőnek megállapítottuk a kromoszómális helyét; bizonyítottuk, hogy ez a két gén azonos proteint kódol. Sikerült olyan spontán mutációt szenvedett törzset találni, amelyben az egyik 70 hsp struktúrgén hibásan működik.

A továbbiakban szeretnénk tisztázni a hő-sokk proteinek celluláris szerepét. Genetikai módszerekkel, a 70 hsp struktúrgének számát tovább csökkentve lehetségessé vált 70 hsp struktúrgén mutánsok előállítására és így a hő-sokk proteinek funkcionális analízise (GAUSZ és mtsai 1981).

Az utóbbi években több közlemény számolt be arról, hogy hő-sokk proteinek a legkülönbözőbb eukariota szervezetekben is képződnek, pl. nyálkagombákban (LOOMIS és WHEELER 1980), amőbákban (WALSH 1980), élesztőben (MCALISTER és FINKELSTEIN 1979), emlős- és madársejtkultúrákban (KELLEY és SCHLESINGER 1978). Jelenleg általában elfogadott nézet, hogy ezek a proteinek szerepet játszanak abban, hogy a magasabb rendű szervezetek alkalmazkodni tudjanak a szélsőséges környezeti viszonyokhoz (ASHBURNER és BONNER 1979). Természetesen ezeket a feltételezéseket további vizsgálatokkal kell igazolni; reméljük, hogy további eredményeink nemcsak *Drosophilára*, hanem más szervezetekre is kiterjeszthetők lesznek.

Az előadásban ismertetett munkában a következő kutatók vettek részt: az SZBK Genetikai Intézetéből: Bencze Gábor, Gyurkovics Henrik, Gausz

János, valamint Abdel Fattah Awad, az SZBK Biokémiai Intézetéből Udvardy András, Csordás-Tóth Éva, Sümegei János, Török István, külföldi kollégáink közül pedig David Ish-Horowicz,¹ Paul Schedl² és Jeanette Holden³ nevét kell megemlíteni.

IRODALOM

- ASHBURNER, M.: Patterns of puffing activity in salivary gland chromosomes of *Drosophila* V. Responses to environmental treatment. *Chromosoma* (Berl.) **31**, 356—376 (1970).
- ASHBURNER, M., BONNER, J. J.: The induction of gene activity in *Drosophila* by heat-shock. *Cell* **17**, 241—254 (1979).
- BEERMANN, W.: Chromomeres and genes. In: Developmental studies on giant chromosomes. pp. 1—34, Berlin, Springer (1972).
- CRAIG, E. A., MCCARTHY, B. J., WADSWORTH, S. C.: Sequence organization of two recombinant plasmids containing genes for the major heat-shock induced protein of *D. melanogaster*. *Cell* **16**, 575—588 (1979).
- GAUSZ, J., BENCZE, G., GYURKOVICS, H., ASHBURNER, M., ISH-HOROWICZ, D., HOLDEN, J. J.: Genetic characterization of the 87C region of the third chromosome of *D. melanogaster*. *Genetics* **93**, 917—934 (1979).
- GAUSZ, J., GYURKOVICS, H., BENCZE, G., AWAD, A. A., ISH-HOROWICZ, D., HOLDEN, J. J.: Genetic characterization of the region between 86F1,2 and 87D3,4 on the third chromosome of *D. melanogaster*. *Genetics* (közlésre elfogadva) (1981).
- GOLDSCHMIDT-CLERMONT, M.: Two genes for the major heat-shock protein of *Drosophila melanogaster* arranged as an inverted repeat. *Nucleic Acid Res.* **8**, 235—252 (1980).
- HOLMGREN, R., LIVAK, K., MORIMOTO, R., FREUD, R., MESELSON, M.: Studies of cloned sequences from four *Drosophila* heat-shock loci. *Cell* **18**, 1359—1370 (1979).
- ISH-HOROWICZ, D., PINCHIN, S. M., GAUSZ, J., GYURKOVICS, H., BENCZE, G., GOLDSCHMIDT-CLERMONT, M., HOLDEN, J. J.: Deletion mapping of two *D. melanogaster* loci that code for the 70 000 dalton heat-induced protein. *Cell* **17**, 565—571 (1979a).
- ISH-HOROWICZ, D., PINCHIN, S. M., SCHEDL, P., ARTAVANIS-TSAKONAS, S., MIRAUULT, M. E.: Genetic and molecular analysis of the 87A7 and 87C1 heat-inducible loci of *D. melanogaster*. *Cell* **18**, 1351—1358 (1979b).
- JUDD, B. H., SHEN, M. W., KAUFMAN, T. C.: The anatomy and function of a segment of the X chromosome of *D. melanogaster*. *Genetics* **71**, 139—156 (1972).
- KELLEY, P. M., SCHLESINGER, M. J.: The effect of amino acid analogues and heat-shock on gene expression in chicken embryo fibroblasts. *Cell* **15**, 1277—1286 (1978).
- LOOMIS, W. F., WHEELER, S.: Heat shock response of *Dictyostelium*. *Dev. Biol.* **79**, 399—408 (1980).
- MCALISTER, L., FINKELSTEIN, D. B.: Transient changes in translational patterns by heat-shock of *Saccharomyces cerevisiae*. Abstract in the molecular biology of yeast meetings, New York (1979).
- McKENZIE, S. L., HENIKOFF, S., MESELSON, M.: Localization of RNA from heat-induced polysomes at puff sites in *D. melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**, 1117—1121 (1975).
- MIRAUULT, M. E., GOLDSCHMIDT-CLERMONT, M., ARTAVANIS-TSAKONAS, S., SCHEDL, P.: Organization of the multiple genes for the 70 000-dalton heat-shock protein in *D. melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 5254—5258 (1979).
- RITOSSA, F.: A new puffing pattern induced by heat-shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* **18**, 571—573 (1962).
- SCHEDL, P., ARTAVANIS-TSAKONAS, S., STEWARD, R., GEHRING, W. J., MIRAUULT, M. E., GOLDSCHMIDT-CLERMONT, M., MORAN, L., TISSIÈRES, A.: Two hybrid plasmids with *D. melanogaster* DNA sequences complementary to mRNA coding for the major heat-shock protein. *Cell* **14**, 921—929 (1978).

¹ Imperial Cancer Research Fund, Mill Hill Labs., London.

² Department of Biology, University of Princeton, Princeton).

³ Department of Biology, Queen's University, Kingston).

- SPRADLING, A., PARDUE, L. M., PENMAN, S.: Messenger RNA in heat-shocked *Drosophila* cells. *J. Mol. Biol.* **109**, 559—587 (1977).
- TISSIÉRES, A., MITCHELL, H. K., TRACY, U.: Protein synthesis in salivary glands of *D. melanogaster*. Relation to chromosome puffs. *J. Mol. Biol.* **84**, 389—398 (1974).
- UDVARDY, A., SÜMEGI, J., CSORDÁS-TÓTH, É., GAUSZ, J., GYURKOVICS, H., ISH-HOROWICZ, D., SCHEDL, P.: Genomic organization and functional analysis of a deletion variant of the 87A7 heat-shock locus of *D. melanogaster*. *J. Mol. Biol. közlésre elfogadva* (1981).
- WALSH, C.: Appearance of heat-shock proteins during the induction of multiple flagella in *Naegleria groberi*. *J. Biol. Chem.* **255**, 2629—2632 (1979).