

Beszámoló az OTKA 79164 pályázatban végzett munkáról.

A muslica 20hidroxi-ekdizon (E) függő teljes átalakulása az egyik jól elemezhető fejlődési modell. A fejlődési események mögött szabályozó gének egymást követő kifejeződése áll, amit az Ashburner modell ír le. A hormon néhány „korai” gént kapcsol be, amik nagyszámú „késői” gén működését szabályozzák, felerősítve a jelet, amik azután a végrehajtó géneket kapcsolják be vagy ki. A korai gének egyike az ekdizon receptort kódoló gén (EcR). A szabályozás központi eleme az E hormon. Az E termelés *de novo* szintézissel valósul, a hormon szintje csak rövid időszakokban nő meg, amplitúdója jellemző az egyes fejlődési állapotokra, ami szigorúan szabályozásra utal. A posztembrionális fejlődés lárva szakasza során az E termelés endokrin mirigyre (protorakális mirigy, PG) korlátozott. Az E termelés szabályozása a hormonfüggő fejlődés egy, az Ashburner modellben szereplő gének feletti szintet képez.

Az E termelés idegi szabályozás alatt áll, ami a *trunk* gén 235 aminosav méretű peptid (=PTTH) és RTK típusú receptora, a *torso* gén terméke kölcsönhatásán keresztül valósul meg. Az E a koleszterin váz átalakításával és sorozatos hidroxilással készül. A szintézis útvonal 6 enzimét írták le, de a folyamat több reakciója és a sebesség korlátozó lépés ismeretlen. A bioszintézist meghatározó géneken kívül több E hiányos mutáció ismert. Ezek egyike a klasszikus, domináns hőérzékeny *I(3)DTS-3* mutáció.

Az *I(3)DTS-3* az *mld* gén allélja.

A *I(3)DTS-3* mutáció génjét: *CG34100* transzpozon (*PlacW*) inszerciós allélokkal azonosítottuk. *CG34100* gén ugyancsak allélikusnak bizonyult a *molting defective* (*mld*) génnel, ezért a hőérzékeny allélt átneveztük: *mld[DTS-3]*. Az *mld* génhez közeli, alkalmas transzpozon inszerciók felhasználásával „split-white” technikával a gént átfedő duplikációt (*Dp(mld)*) és deléciót (*Df(3R)ED6189*) állítottunk elő. A korábban izolált, két inszerciós *mld* allél (*S119307* és *S133715*) mellé beszereztünk EMS indukált amorf allélokat (*mld[47]*, *mld[92]*) valamint a gén területére eső, un MiMIC inszerciókat hordozó törzseket.

A *DTS-3* mutáció antimorf természetű.

Az *mld[DTS-3]* restriktív hőmérsékleten (29°C) a hemizigóta embrió letális, a heterozigóta lárva letális, a duplikáció életképes (*mld[DTS-3]/Df(mld) > mld[DTS-3]/+ > mld[DTS-3]/Dp(mld)*=vad típus), vagyis a gén dóziszváltozásra antimorf allélokra jellemző fenotípus különbségeket mutat. Az antimorf fenotípus a mutáns Mld fehérje mérgező természetével magyarázható. Permisszív hőmérsékleten azonban recesszív letális, funkcióvesztéses allélként viselkedik (*mld[DTS-3]/Df(mld) > mld[DTS-3]/+ = mld[DTS-3]/Dp(mld) = vad típus*). Permisszív hőmérsékleten nevelt hemizigóta L1 letális és sem élettartama, sem mérete nem különbözik az EMS indukált amorf allélok (*mld[47]*, *mld[92]*) homo- és hemizigótáitól, amorf természetűnek tekinthető.

Az *I(3)DTS-3* fenotípusért a TRASH doménben csonkolt Mld felelős.

Az *mld* lókuszt egy átlagos muslica génnél ötször terjedelmesebb, 37 kb DNS szakaszon elterülő gén. A génről két, közeli, promoterről, kisméretű exonok kombinálásával öt, hasonló méretű (7 kb), különböző transzkript készül. Az Mld kódolta fehérjék nem tartalmaznak enzim aktivitásra utaló doméneket. Az öt izoforma mindegyike tartalmaz az N-vég közelében egy fehérje-kölcsönhatásért felelős AD-típusú, C-terminálisan hét DNS kötő C2H2-típusú Zn-ujjat, valamint középen egy, feltehetőleg a fémion transzportban szerepet játszó, TRASH domént. Az Mld domén szerkezete transzkripciós faktor szerepre utal.

Az *mld*[DTS-3] allél mutációs hely meghatározását hemizigóta mutáns templáton, az *mld* transzkriptet lefedő PCR, átlagosan 0,6 kb méretű termékek nukleotidsorrend leolvasásával végeztük. Az eredmények megerősítésére az *mld*[DTS-3] mutációval egy kísérletben izolált, nem allélikus, másik mutáció, a *I(3)DTS-4* templáton nyert PCR termékek és az *mld*[DTS-3] heteroduplexein Cel1 enzimmel végzett hasítást elemeztük (TILLING). A két kísérlet eredményei egybehangzóan ugyanazokon a szakaszokban jeleztek eltérést. A mutációt a GénBank sorrendhez képest, mint 3R: 20.442.765 helyzetű T/A báziscserét azonosítottunk. A módszer ellenőrzésére az *mld*[92] allél sorrendjét is leolvastuk. Ebben a DNS-ben az irodalmi adatoknak megfelelő helyen (3R: 20.442.619) azonosítottuk az *mld*[92]-re jellemző A/T cserét.

Az *mld*[DTS-3] DNS-ben azonosított báziscsere az *mld-PA* izoforma 548-ik cisztein kodonját (TGT) stop kodonná (TGA:opal) változtatja (C548@), amivel a fehérje mérete harmadára (1918 as-ról 548-ra) csökken. A mutáció a TRASH domén 3 állandó cisztein (C-X₂₂-C-X₃-C) C-terminális tagját törli. TRASH a prokariótákban fém-ion transzportban fontos, eukariótákban nem ismeret a szerepe.

Az *mld*[92] mutációja 500 as méretű csonkolt fehérjét eredményez, amiről a TRASH hiányzik. Ez a mutáció nem hőérzékeny. Az *mld*[DTS-3] domináns hőérzékeny fenotípusért a sérült TRASH domén lehet a felelős.

Mld ellenanyag előállítás.

Az *mld* A izoforma cDNS Zn-ujjat kódoló szakaszait két darabban pET28 ill. pET41 expressziós vektorba kónoztuk, kifejeztettük, és a His-tag felhasználásával, Ni oszlopon kitisztítottuk. A tisztított fehérjék ellen csirkében ellenanyagot termeltettünk. Az ellenanyagok az expresszázó baktérium fehérje kivonatában a megfelelő molekulásúlyú fehérjével erős reakciót mutattak Western blot-ban, de kereszt reakciókat is mutattak minden hígításban. Az ellenanyag tulajdonságait sikerült javítani E.coli aceton csapadék porával. A kromoszóma festéshez használt ellenanyagot SDS-PAGE elválasztott és filterre rögzített antigénnel affinitás tisztítottuk.

Az *mld* gén az ekdizon termeléshez szükséges.

A *I(3)DTS-3* mutáció kondicionális természete lehetővé teszi a pleiotróp fenotípusok azonosítását. Ezek szerteágazók, és minden fejlődési alakot érintenek. A hormonhiánnyal kapcsolatba hozható fenotípusok az embrió és többfázisú lárva letalitás, a nőstény sterilitást, de a kifejlett nőstények megnyúlt élettartama, hosszú távú memória és alvás zavar magyarázatára az E hiány legfeljebb áttételesen szolgál magyarázatul. Az *mld* amorf allélok fenotípusa az első lárvaszakaszban (L1) bekövetkező lárva letalitás megnyúlt élettartammal járó változata, amit extended first instar (EFI)-nak nevezhetünk. A mutánsok a vad típus L1 életideje többszöröséig élnek, növekszenek, eléri a késői L2 méretét, azonban nem vedlenek, és végül nyilvánvaló tünetek nélkül elpusztulnak. Nyilvánvaló, hogy az *mld* gén terméke nélkülözhetetlen a vedléshez. A mutáns lárvák E adásával normális ütemű továbbfejlődésre és bábozódásra bírhatók. Kimutattuk, érzékeny RIA-vel, hogy az *mld* amorf allélok és az *mld*[DTS-3] hemizigóta lárvák kevés, a vad típusú állatokhoz képest mindössze 5-10%, hormont tartalmaznak. A fejlődés tehát az E hiány miatt akad el, és a mutáció nem érinti a hormon választ. Az *mld* funkciója tehát nélkülözhetetlen az E termeléshez.

Az *mld* az ekdizon szintézis kezdeti szakaszához szükséges.

Az E-t a rovarok koleszterinből szintetizálják. A koleszterin - ekdizon biszintézis út néhány közti terméke ismert. Ezek közül ketodiollal (2,22,25-trideoxyecdysone) és triollal (2,22-dideoxyecdysone) menekíteni tudtuk mutáns lárvákat, de koleszterinel

és 7dehidro-koleszterin nem. Az *mld* tehát a 7dehidro koleszterin és ketodiol közötti lépésekhez szükséges. Ezek a lépések nem ismertek, az útvonal „black box” névvel jelölt részébe tartoznak. Az *Mld* transzkripció faktorokra emlékeztető domén szerkezete arra utal, hogy vagy a szükséges enzimek génjeit szabályozza, vagy a PG hormontermeléshez szükséges kompetencia kialakításához szükséges. Az *mld* mutáns lárvákban az E bioszintézis gének transzkriptumai szintjét normális, vagy közel normális szintűnek találtuk RT-PCR vizsgálatokkal.

Az *mld* lárva specifikus ekdizon termelés szabályzó.

Az *mld* amorf allélek ekdizon menekíthetősége nem csak azt jelzi, hogy az *mld* nélkülözhetetlen az ekdizon termeléshez a lárvákban, hanem azt is, hogy az ekdizon termelés és ekdizon jelátviteli út sértetlen a mutánsokban. Az ekdizon bioszintézisben résztvevő enzimeket kódoló gének (Halloween gének) mutánsainak mindegyike embrió letális, továbbá az *EcR* hiány is embrió letalitással jár, azaz az ekdizon és hatása nélkülözhetetlen az embrió fejlődéséhez. Feltételezhető, hogy az *mld* amorf mutánsok azért mutatnak *EFI* fenotípust az embrió letalítás helyett, mert a zigótikus *mld* funkció hiányt a heterozigóta anya pótolja, vagyis az *mld* az *EcR*-hez hasonlóan anyai hatású. Az *mld* anyai hatását csíravonal mozaikokban ellenőriztük. Domináns nősténysteril *Flp/FRT OvoD* rendszerben, homozigóta mutáns (*mld/mld*) petecsöveket készítettünk és azt tapasztaltuk, hogy a homozigóta amorf *mld* csíravonalból a kontrollal azonos számú, azonos életképességű és fertilitású peték származnak. Vagyis az *mld* nem anyai hatású gén, és az *EFI* a funkció kiesése okozta valódi zigótikus fenotípus és nem anyai hatás okozta késleltetés okozza.

Az *mld* amorf allél hemizigóták életképességét és fejlődési idejét zöld fluoreszcens fehérjét (GFP) kifejező balanszer kromoszóma segítségével azonosítva megállapítottuk, hogy azok életképessége és fejlődési ideje nem különbözik heterozigóta testvéreiktől. Ebből és a csíravonal mozaik kísérletek eredményeiből arra következtettünk, hogy az *mld* gén szerepe nélkülözhető az embrióban zajló fejlődési folyamatokban, közöttük az embrionális E termelésben. A mutánsok lárva fenotípus elemzése viszont egyértelművé teszi, hogy az *mld* nélkülözhetetlen a L1 lárva ekdizon szintéziséhez. Vagyis az *mld* gén ekdizon termelést szabályzó szerepe a lárva életre korlátozódik. Az ellentmondás feloldható, ha feltételezzük, hogy az E termelés mechanizmusa az embrióban és a lárvaiban különböző.

Az embrió E termelő szöveteit nem sikerült eddig azonosítani. A rovarok protorakális mirigye *musca* megfelelője a gyűrűmirigy (RG) tömegének nagy részét kitevő oldali sejtcsoportja, amit ezért protorakális mirigy (PG) sejteknek is neveznek. Ezek a sejtek csak az embrionális E titer csúcs után alakulnak ki, ami kizárja, hogy ebben a fejlődési állapotban a PG sejtek termeljenek a hormont.

A legyek, beleértve a *musca* lárvaélete során az E forrása a RG. Az *mld* csendesítése (minden *mld* izoformát csendesítő) a RG-ben (*P0206Gal4* és *phmGal4*) az amorf allélok fenotípusával azonos, *EFI* fenokópiát-t eredményez. Az *mld* csendesítése a nyálmirigyben nem okoz fenotípust. Ezek az eredmények további bizonyítékot szolgáltatnak arra, hogy az *mld* az ekdizon termelés szereplője, valamint hatását az E termelő endokrin szövetben fejeti ki. Az eredmények összhangban vannak a megfigyeléssel, hogy az *mld* enhanszer csapdázó $P\{lacW\}$ inszerciós allélokban a lacZ aktivitás a lárva szövetek közül a RG-ben a legerősebb.

Kondicionális-Gal4 (*hs-Gal4*) irányított *mld*-RNAi csendesítéssel megállapítottuk, hogy az L1 állapotú lárva fejlődése csak akkor akad el, ha az *mld*-t a szakasz közepén a kikelés követő 12-16 órák között kapcsoljuk ki. Ez a fenokritikus szakasz egybeesik a magas E titer idejével. Ez újabb bizonyítékot szolgáltat az *mld* E termelésben játszott nélkülözhetetlen szerepére.

Az *mld* egy szövet specifikus növekedési faktor hatású

Az *l(3) DTS-3* mutáció jellegzetes fenotípusa a hipertróf gyűrűmirigy. A *DTS-3/+* lárvák RG mérete többszöröse a vad típusú gyűrűmirigy maximális méretének. A hipertrófiát nem a sejtek számának növekedése, hanem a PG sejtek méretnagyobbodása okozza. A PG sejtek megnagyobbodása a politénia szint emelkedésével jár, ami legtöbbször eléri a nyálmirigy sejtekben megfigyelhető ezerszeres mértéket. Ha fluoreszcen nukleotid analóggal (EdU) láthatóvá tettük a DNS szintézis mértékét, *mld[DTS-3]* lárvák PG sejtjeiben jelentősen intenzívebb DNS szintézist találtunk, mind az vad típusban. Ez a fenotípus az *mld[DTS-3]* mutánsra is jellemző, azonban ezekben ez domináns jelleg, és csak restriktív hőmérsékleten jelentkezik.

A PG sejtek mérete és az adult testméret között fordított összefüggést mutattak ki. A kapcsolatban az inzulin jelzőrendszer fontos szerepet játszik. A kapcsolatot leíró modell szerint a nagyobb mirigy több hormont termel, ezért a táplálkozó lárvá élet hossza lerövidül a hamarabb bekövetkező bábozódás miatt, ami korlátozza a kifejlett állat méretét.

A PG hipertrófiáját az *mld* amorf allélok homo- és hemizigótáiban is megfigyeltük. Ebből arra következtetünk, hogy az *mld* a RG növekedés/politénia negatív szabályzója. Az *mld* gén terméke domén szerkezete alapján feltehetőleg transzkripció faktor. Megvizsgáltuk *mld* homo- és heterozigóta valamint vad típusú sejtekből álló RG genetikai szomatikus mozaikokban a különböző genotípusú sejtek méretét. Egyik kísérletben *mld[PlacW]* inszerciós mutánsokban indukáltunk vad- és homozigóta mutáns sejtekből álló mozaikot. A lacZ markerrel a vad típusú sejtek egyértelműen azonosíthatók. Másik kísérletben MARCAM technikával *mld* amorf allélok és GFP markerrel nyertünk mozaikokat, amikben a homozigóta mutáns sejteket azonosítottuk. Mindkét kísérletben a mozaikot alkotó sejtek mérete azonosnak bizonyult a genotípustól függetlenül. Az eredményekből arra következtetünk, hogy az *mld* hatása nem autonóm a RG méretére. Az eredmény meglepő, és arra utal, hogy az *mld* PG sejt növekedését befolyásoló hatását közvetetten fejt ki.

Korábbi kísérleteink során megfigyeltük, hogy a muslica lárvákban történő ekdizon szintézis fenarimollal végzett farmakológiai gátlása L1 állapotban felfüggeszti a fejlődést, és a RG hipertrófiáját okozza. Mind a fejlődés gátlás, mind a RG hipertrófia fenotípus E etetéssel felfüggeszthető. Vagyis az E hiánya okozza a RG hipertrófiát. Az E a PG sejtek növekedését gátolja. Ha az E hatás fő közvetítőjét az ekdizon receptor (EcR) csendesítése a RG-ben ugyancsak PG hipertrófiát eredményezett. Az eredmény alátámasztja a következtetést, hogy az ekdizon gátolja a PG sejtek növekedését, és megmutatja, hogy ez az EcR-en keresztül valósul meg. Megmagyarázza továbbá az *mld* nem-autonóm hatását, miszerint a hatást az E hormon közvetíti. Továbbá példát szolgáltat az endoreplikáció hormonális szabályzására.

A jelenség elemzése egy visszacsatoló szabályzást tár fel. A PG termelte E fékezi a mirigy növekedését, ami csökkenti a hormontermelést.

Az *mld* a RG működéséhez nélkülözhetetlen.

Az enhanszer csapdázó, *mld* gént inaktiváló PlacW inszerciók lacZ festése erős enzim aktivitást mutat a lárvák PG sejtjeiben, ennél jóval gyengébb festődést az agy néhány sejtjében, a nyálmirigyben és a zsírtestben. A festődés utalhat az *mld* kifejeződés szöveti mintázatára, arra, hogy az *mld* PG-ben kifejeződik.

Az *mlt* csendesítése RG specifikus meghajtókkal (P0206-Gal4, phm-Gal4) az amorf allélok fenotípusával azonos fenokópiát eredményezett. Az eredmény megerősíti, hogy az *mlt* a RG-ben kifejeződik.

Az *mlt* transzkripció kezdőpontja és a szomszédos génig terjedő 5', mint feltételezhető szabályzó szakaszt GFP riportert tartalmazó (*pH-Stinger*) transzformációs vektorba vittük, hogy láthatóvá tegyük a kifejeződését. A transzformált legyek a RG-ben nem, csak a ventrális ganglion a hosszanti tengelyében fekvő néhány sejtjében mutattak gyenge GFP fluoreszcenciát. Az *mlt* szabályzását feltehetőleg nem, vagy nem csak a rövid (0,5 kb) méretű 5' szakasz biztosítja.

Az *mlt* gén 38 kb DNSre terjed ki, transzkriptjei 7 kb méretűek. Szerkezete a fejlődés szabályozott génekre jellemzően 5' felén kis, nem transzlálódó exonokból és nagy intronokból épül fel. Gyakran ezek az intronok felelősek az enhancere hatásért. Az *mlt* első intronja 5, a második 24 kb méretű. Ezek kényelmetlenül hosszú szakaszok riportert vektorba klónozáshoz.

A muslica, Gal4 meghajtóval felszerelt potenciális „enhanszer” könyvtár kilenc *mlt*-t érintő tagja közül egy, GMR94C02, esetén az *mlt* amorf fenotípussal azonos fenokópiát kaptunk, ha az *mlt* csendesítéséhez használtuk. A többi nyolc meghajtó hatástalannak bizonyult a tesztben. Az eredmény azt jelzi, hogy az enhanszer vagy azonos az *mlt* enhanszerrel, vagy hatása átfedi azt. GMR94C02 EGFP riporterral együtt jellegzetes mintázatot eredményez, a erős expressziót a RG-ben, gyenge kifejeződést az izmokban mutat. GMR94C02 enhanszer az *mlt* legnagyobb exonja közepéről származó 3,7 kb méretű szakasz. Sikerült azonosítsunk egy enhanszer motívumot, ami az *mlt* expressziójával átfedő mintázatban eredményezi a Gal4 kifejeződését.

Az *mlt* kifejeződési mintázat láthatóvá tétele MiMIC inszerciókon végrehajtott riporterkazetta cserével (RMCE).

A Minos transzpozon egyik módosított változata (MiMIC) hordoz két fág eredetű helyspecifikus rekombinációs helyet, ami lehetővé teszi, hogy a oda riportert konstruktokat lehessen beépíteni. Beépíthető a cserével olyan kazetta is, ami a riportert (pl. EGFP) sorrendet úgy hordozza, hogy az splice reakcióval beépül az érintett gén transzkriptumába. Az eredményezett fúziós fehérje tulajdonságai a riportert sajátjaival bővül. Az *mlt* gén nagy intronja két szélén két MiMIC inszerció (*mlt*[MI01185], *mlt*[MI07175]) ékelődött be, ezek felhasználásával kíséreltünk meg riportert építeni az *Mld*-ben avval az igénnyel, hogy követni tudjuk az *Mld* fehérje kifejeződését térben és időben a muslica élete során.

Két kísérletet hajtottunk végre. Három különböző riportert hordozó kazettát használtunk, EGFP, RFP és HRP. A disztális MiMIC inszerciót használva kazettánként 80, a proximális inszercióval 120 EGFP transzformánst elemeztünk. A jelölteket a *yellow* kazetta vesztésére szelektáltuk, és törzsbe állítottuk. A riportert kazetták irányultságát és helyzetét megfelelő PCR termékek alapján állapítottuk meg. Az EGFP cseréből 11, az RFP cseréből 1, a HRP cseréből 4 törzset kaptunk. Ezek egyikében sem sikerült a riportert aktivitását látni. A törzsek 3 életképes kivételével az *mlt*-vel allélikus recesszív letálisnak bizonyult. A riportert látható aktivitás elmaradása magyarázatául több alternatíva kínálkozik: a) az RMCE során sérült a sorrend, ami kereteltolódás eredményez, és nem készül sértetlen EGFP; b) az *Mld*-be fuzionált EGFP nem képes felvenni a fluoreszcenciához szükséges konformációt. c) Minden pontosan és jól működik az RMCE során, de az *Mld* és emiatt a fuzionált EGFP túl alacsony a vizualizációhoz. Jelenleg anti-GFP ellenanyaggal, érzékeny Western blottokon keressük a fúziós GFP terméket.

Mld kölcsönható partnerek azonosítása Y2H rendszerben.

Kísérletet tettünk az Mld kölcsönható partnerei meghatározására élesztő kéthibrid rendszerben. A *mld* cDNS-t két 5' és 3' felét pBTM116 vektorba klónoztuk. Az 3' darab önaktiválóként viselkedett. Az 5' szakasszal pP6 vektorba klónozott 12-14 órás muslica embrió cDNS könyvtárat szűrtünk. A Gal4 aktiváló doménhez fuzionált *mld* 5' darab két kölcsönható fehérjét azonosított, amik a *CG11275* és a *CG10118* (=pale, a muslica tirozin monooxygenáz). *CG11275* egy ismeretlen funkciójú, a transzkripció represszorokra jellemző BTB/POZ domént hordozó transzkripció faktor. *CG10118* a tirozin anyagcsere sebességszabályzó lépését katalizáló tirozin-monooxygenáz enzimet kódolja.

Az Mld a kromatin szerkezet módosító rendszer komponense.

Az *mld* genetikai funkciója nélkülözhetetlen a muslica lárvák fejlődéséhez nélkülözhetetlen, ezen belül az E termeléshez szükséges. Az *mld* mutánsokban azonban az E bioszintézis lépéseit katalizálásáért felelős, ismert enzimek génjei, (*dib*, *phm*, *shd*, *sed*) a vad típushoz hasonló mértékben fejeződnek ki (saját és mások adata). Az *mld* nem a Halloween gének kifejeződésén keresztül hat. Az *mld* vagy a bioszintézis út eddig nem azonosított szereplőit szabályozza, vagy valami általánosabb szereppel bír. Az *mld*[DTS-3] domináns fenotípus genetikai szupresszióját eredményező mutánsok izolálásával azonosítottuk a gén kölcsönható partnereit. A muslica genetikai állomány 80%-át kitevő két nagy autoszómjához tartozó gének EMS mutagenézisét követően, F1 szűréssel, a második (31ezer) és harmadik (15ezer) kromoszómára külön kísérletben izoláltunk domináns szupresszorokat. A szűrési feltétel a kiterjedt harmadik lárva állapot (*extended third instar*, *ETI*) elnyomása, a bábok és a kifejlett állatok megjelenését használtuk. Összesen 14 (8 a harmadik, 6 a második kromoszómán) szupresszor lókuszt azonosítottunk. Eddig a harmadik kromoszómára esőket (*Su(3)DTS-3*) rendeltük génhez, a második kromoszómához tartozókat (*Su(2)DTS-3*) szűk kromoszóma szakaszra térképeztük.

A *Su-DTS-3* jelöltek térképezése.

A recesszív letális jelölteket (97) térképeztük. A jelölteket a kromoszóma karok közepén elhelyezkedő w+ markert hordozó letálisokhoz (elsősorban ED deléciók) rekombinációval térképeztük. A közel térképeződő jelölteket komplementáltattuk. Egy 6, egy 3 és egy 2 tagú komplementációs csoportot azonosítottunk. Ezután a rekombinációs távolságok által kijelölt kromoszómaszakaszt lefedő nagyméretű deléció sorozattal pontosítottuk a térképhelyzetet. A nem komplementáló deléció területét átfedő, kisméretű deléciókkal szűkítettük a térkép helyet 10-100 kb méretűre. Végül a szakaszra eső gének letális alléjeit használva komplementációval azonosítottuk a szupresszor lókuszt. Néhány esetben, amikor a deléciós térképezés eredménytelen volt, megismételtük a rekombinációs térképezést közelebbi w+ markerekhez. Más esetekben (4) nem jutottunk átfedő delécióhoz, vagy a szakaszra eső letális allélok mindegyike komplementálta a jelöltet (3). Ezeket az azonosítatlan térképhelyzetű jelölteket nem elemeztük tovább. A második kromoszómás jelöltek térképezésében a finom felbontású deléciós térképezésig jutottunk el. A következő szupresszor lókusztokat azonosítottuk: *CG13676*, *gfzf*, *CG7006*, *Fit1*, *not*, *jumu*, *InR*, *RpS27*, *I(2)S073002a*.

A *Su(3)DTS-3* lókusztok természete:

A szupresszió várt mechanizmusa az E termelés helyreállítása. Az azonosított szupresszor gének egyikéről sem ismert, hogy az ekdizon termelésben részt vesz. A lókuszt pontosággal még nem térképezett jelölteket lefedő deléciók területén sem lelhető fel az E szintézisút ismert komponensei. A *Su-DTS-3* allélok génjei funkcióját

leíró Gén Ontológia (GO) a sejtbeli elhelyezkedés szempontjából a szupresszorok minden fő kompartmentet képviselnek: extracelluláris (CG13676), plazma membrán: (*InR*), citoplazma: (*RpS27*, *Fit1*), sejtmag: (CG7006, *not*, *jumu*, *gfzf*). Az Mld ellenanyagfestés nukleáris lokalizációt mutat, ezért a CG13676, *RpS27*, *Fit1* esetén, amik GO besorolása sejttagon kívüli, az Mld között közvetlen kapcsolatot nem tételezünk fel. A szupresszorok molekuláris funkciói ugyancsak nagyon különbözők: kitin kötés (CG13676), glutathion-transzferáz és nukleinsav kötés (*gfzf*), RNS kötés (CG7006), sejt-sejt kapcsoló (*Fit1*), ubikvitin specifikus proteáz (*not*), kromatin fehérje, SAGA komplex alegység (*jumu*), inzulin receptor tirozin kináz (*InR*) és riboszóma fehérje (*Rps27*). Közös funkciónak tűnik a kromatin kapcsolat, ami a *jumu*, a *not*, a *gfzf* esetén igazolt. Az Y2H rendszerben igazolt kölcsönható partner a CG11275 BTB/POZ domén TF is ebbe a csoportba tartozik.

Affinitás tisztított ellenanyagokkal sikerült a nyálmirigy kromoszómákat festeni. Az ellenanyag festés erőssége nem követi az egyes sávok DNS tartamát (DAPI), ezért specifikusnak tekintjük. Sok kromoszómasáv festődik az *mld* ellenanyaggal, hasonlóan (bár kevesebb sáv), mint a kontroll kromatin fehérje (*a-prod*) ellenanyag esetén. A két fehérje festése eltérő mintázatot mutat. A kromoszóma festés eredményei azt mutatják, hogy a kromoszóma eukromatikus szakaszán helyezkedik el az Mld, és úgy viselkedik, mint egy kromoszóma fehérje, és nem halmozódik fel néhány, vagy néhányszor tíz helyen, mint specifikus (pl. ekdizon bioszintézis) gének esetén várnánk. A *not* és a *jumu* ugyancsak kromoszóma fehérjék, amikről ismert, hogy különféle kromatin módosító folyamatok szereplői.

Megvizsgáltuk, hogy a kromatin állapotát tükröző pozíció effektus variegációt (PEV) befolyásolják-e a szupresszor hatású *not* allél. A közelmúltban várt ismertté, hogy Not a H2a és H2B hisztonok ubikvitin módosítása eltávolítását végző enzim, és részt vesz a HAT komplexel együtt a kromatin szerkezet lazításában. Azt tapasztaltuk, hogy mind a szupresszor hatású *not* allél nem mutat PEV enhanszer hatást a *w[m4]* szondán, azaz a Not ELP fenotípust menekítő mutációja kromatin módosító funkcióját nem érinti. Egy másik szupresszor a *jumu* ugyancsak hat a PEV-ra. A szupresszorként viselkedő *jumu* allélt azonban ebből a szempontból nem vizsgáltuk.

Megvizsgáltuk ezért az *mld[DTS-3]* és az *mld* amorf allélok (*mld[47]*, *mld[92]*) PEV-re gyakorolt hatását, és mind a három esetben PEV enhanszer hatást találtunk. Ez igazolja, hogy az *mld* vad típusú funkciója kapcsolatos a kromatin szerkezettel. Meglepetésre azt is tapasztaltuk, hogy butirát (HAT gátló) kezelés restriktív hőmérsékleten menekíti (bábozódni engedi) az *mld[DTS-3]* lárvákat. Ez az eredmény jól összhangba van a kromoszóma festés eredményeivel és a PEV enhanszer hatással.

Egy másik Su(3)DTS-3 a *jumu* gén mutációja. *Jumu* egy több funkciójú kromatin fehérje, ami dóziszfüggő módon a PEV szupresszora vagy enhanszere.

Kísérlés az Mld Zn-ujjak sorrend specifikus DNS kötése kimutatására.

Az Mld 7 H2C2 Zn-ujj motívuma Specifikus DNS sorrend kötő tulajdonságra utal. Az Mld Zn-ujj motívumait tartalmazó részét kifejeztettük pET rendszerben, a fehérjét a His-tag felhasználásával, Ni oszlopon tisztítottuk. A rekombináns Mld darabokkal pUC19-ben készült muslica genomikus könyvtárból DNSt tisztítottunk, és azokat Ni oszlopon immobilizált rekombináns fehérjével *in vitro*, szűrtünk. A szűrés során 50-100 genom méretnek megfelelő mennyiségű DNS-t használtuk, az elucióval visszanyert klónokat baktériumba transzformáltuk. 12 klónból felsokszoroztuk az inszertet és meghatároztuk a széli sorrendet. A sorrendeket bioinformatikai eszközökkel egymáshoz hasonlítottuk illetve kikerestük a muslica genomban. A

sorrendek között homológiákat csak 16-21 nt hosszúságú szakaszokon találtunk. A sorrendek legtöbbje a muslica genomban génmentes szakaszokkal homológ, mindössze négy hordoz gén területére eső homológiát, kódoló és intron szakaszokkal egyaránt. Nem sikerült adatokat azonosítani, amik valószínűsítenék az Mld sorrend specifikus kötődését.