

IX. Erdélyi Tudományos Diákköri Konferencia
Kolozsvár
2006. november 25-26.

A hsp70 stresszfehérje-gének száma és a termékenység kapcsolata

Szerzők:

**Kovács Levente
Sajgó Szilárd
Crăciunaş**

Babeş-Bolyai Tudományegyetem
Biológia-Geológia kar
Biológia szak
II. évfolyam

Témavezetők:

**dr. Kósa Ferenc
prof. Cornelia**

Babeş-Bolyai Tudományegyetem
Biológia-Geológia kar
Kísérleti biológiai tanszék

dr. Sőti Csaba

Semmelweis Orvostudományi Egyetem
Általános Orvostudományi kar
Orvosi kémiai tanszék

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	4
2. Felhasznált anyagok és módszerek	7
2.1. A muslicatenyésztésre használt táptalaj	7
2.2. Az ecetmuslica (<i>Drosophila melanogaster</i>) törzsek	7
2.3. A termékenység mérése	9
2.4. A szaporítókészülék anatómiai vizsgálata	11
2.5. Az adatok statisztikai elemzése	11
3. Eredmények	12
3.1. A termékenység mérésének eredményei	12
3.2. Az anatómiai vizsgálatok eredményei	14
4. Következtetések és további célkitűzések	16
Köszönetnyilvánítás	19
Irodalomjegyzék	20
Mellékletek	

1. Bevezetés

Sejtjeinkben a káros környezeti hatások (magas hőmérséklet-ingadozások, oxigénhiányos állapot, toxinok stb.) következtében károsodnak az azokat felépítő makromolekulák, mindenekelőtt a fehérjék. Erre a károsító hatásra válaszként a sejt fokozza az úgynevezett stresszfehérjék szintézisét. E fehérjék elsődleges feladata a stresszhatás során károsodott egyéb fehérjék szerkezetének kijavítása, reménytelen esetben pedig lebontása vagy közvetítése egyéb lebontó struktúrák, például a proteaszómák felé. Ilyenformán a stresszfehérjék nélkülözhetetlen szerepet töltenek be a sejtet ért károsodások következményének mérséklésében, az egyensúly helyreállításában.

E fehérjék azonban nyugalmi állapotban is jelen vannak a sejtekben. Egyes képviselői, mint például a Hsp90 jelzésű, jelentős mennyiségűt, akár 1-3 %-át is kiteheti a sejt összfehérjetartalmának. E fehérjecsalád bizonyos tagjai segítenek az újonnan szintetizálódó fehérjék betekeredésében, végleges szerkezetük elnyerésében (ezért őket még dajkafehérjéknek, angolszász szakirodalomban chaperon-oknak is nevezik). Mások a nyugalmi állapotban is előforduló fehérjeaggregátumok „szétcincálására”, megszüntetésére specializálódtak. Megint mások fontos sejten belüli jelátviteli utakban töltenek be nélkülözhetetlen szerepet, bizonyos enzimeket aktiválnak vagy éppen az alanyanyagcsere során fellépő oxidáció ellen védnek, résztvesznek a sejt homeosztázisának fenntartásában (Csermely, 2001).

A sejtben betöltött diverz funkcióik ellenére a stresszfehérjékről mindössze a hatvanas évek elejétől van tudomásunk. *Ritossa és munkatársai* a *Drosophila melanogaster* ecetmuslicát használva modellszervezetként, azt észlelték, hogy a lárvák magas hőmérséklettel való kezelése (hősokkolása) után az kipreparált óriáskromoszómákon kis kidudorodások, kipuffosodások jelentek meg. Ez a jelenség az adott helyen található gének intenzív átíródására, transzkripciójára utal. A jelenséget alaposabban kivizsgálva arra a következtetésre jutottak, hogy a hősokra válaszul a szervezet felfokozza bizonyos fehérjék szintézisét. E fehérjéknek fontos szerepe van a sejtekben bekövetkező károsodások mérséklésében, a stressz elviselésében (Ritossa és mtsai, 1962).

Mivel e fehérjecsaládot először a magas hőmérsékletes kezelések során írták le, számos képviselőjüket hősokkfehérjének hívják, angolszász elvezése Heat shock protein, rövidítve Hsp.

A mi kutatásunk tárgyát is egy ilyen hősokkfehérje, nevezetesen a Hsp70 jelzéssel ellátott képezi (a 70, arra utal, hogy molekulatömege 70 kDa) (1. ábra)

A Hsp70-család tagjai változatos szerepet töltenek be a sejten belül. Normál, stresszmentes körülmények között segítenek az újonnan szintetizálódó fehérjéknek működőképes végső, natív szerkezetüket megtalálni. Ugyanakkor a csekély mutációt elszenvedő fehérjéket is képesek bizonyos esetekben normális állapotba felgöngyölíteni, így egyes mutációk rejtve maradhatnak.

Stressz (mondjuk hősokk) során a roncsolódott, sérült szerkezetű fehérjéket a Hsp70-esek képesek kijavítani, így jelentős szerep jut neki a sejt stressztűrő képességének növelésében. Ebben a helyzetben fellépő fokozott hősokkprotein igénybevételt a sejt úgy igyekszik kompenzálni, hogy növeli mennyiségüket szintézisük fokozásával. Ezért a citoszólban és a sejtmagban kimutatható egy állandóan jelen lévő (konstitutív) és egy hőindukált Hsp70 (Csermely, 2001).

A Hsp70 szerepének fontosságát mi sem bizonyítja jobban annál, hogy az őt kódoló gének szinte változatlan formába fennmaradtak az evolúció során és megtalálhatóak úgy a baktériumokban, mint a muslicában és az emberben is. Baktériumokban egyetlen ilyen gén van (jelölése DnaK), az emberben változó számú, míg az általunk modellszervezetnek használt muslicában jól definiálhatóan 10 darab egyforma ilyen gén van.

Habár molekuláris szinten jól meghatározott a működési mechanizmusa ennek a fehérjecsaládnak, a szervezet magasabb szintű élettani folyamataiban (életkor, termékenység, egyedfejlődés, anyagcsere stb.) betöltött szerepei máig nincsenek egyértelműen meghatározva.

Korábbi kutatások kimutatták, hogy ha enyhébb stresszel kezeljük a sejtet, a szervezetet (úgymond prekondicionáljuk), akkor később könnyebben visel el sokkal zordabb környezeti ráhatásokat. Például a tömegstresszelt ecetmuslicáknak nagyobb a hősokktűrő képessége a nem tömegstresszeltekéhez képest. Ez a jelenség többek közt a Hsp70 fokozott indukciójával, emelkedett sejtbeli koncentrációjával van összefüggésben (Kovács, 2004; Borash és Ho, 2001; Csermely, személyes kommunikáció).

A Hsp-k szerepe az egyedfejlődésben és bizonyos alaktani elváltozásokban is tetten érhető. *Gausz János és munkatársai* kimutatták, hogy a kevesebb hsp70 génkópiát (1-2-őt a 10 helyett) hordozó *Drosophila* mutánsok hosszú, megnyúlt potrohhall, deformált szárnnal, lágy kutikulával rendelkeznek (Gausz és mtsai, 1979; Gausz, cikktöredék).

Nem közvetlenül a Hsp-eket, hanem egyik legfontosabb szabályozó fehérjéjüket, a hősokkfaktor 1-et (röviden HSF1) egérben vizsgálták. Azt találták, hogy ez az enzim befolyásolja úgy az embrionális, mint a posztembrionális fejlődést, illetve részt vesz a gyulladások elleni védelemben (Christians és Benjamin, 2005; Xiao és mtsai, 1999).

A hősokkfaktor *Drosophila* analógját vizsgálva megállapították, hogy bennük az emlősöktől eltérően kisebb szerep jut a HSF-nek. Az egyedfejlődésben betöltött szerepe csupán az ovogenézisre és a lárvastádiumra korlátozódik (Jedlicka és mtsai, 1997).

A HSF és a Hsp70 kapcsolata csak stresszes körülmények között igazolt. Nem végeztek vizsgálatokat arra vonatkozóan, hogy nyugalmi körülmények a HSF vajon a Hsp70-en keresztül hat-e, vagy (mint Jedlicka és munkatársai felvetése szerint) egyéb géneken keresztül fejtené ki hatását.

A kérdés egyértelmű megválaszolásához olyan kísérlet szükséges, amely közvetlenül a Hsp70-nek nézné például az ovogenézisben betöltött szerepét. *Drosophiláknál* az ovogenézis hatékonyságának becslésére az adott genotípusú nőstények termékenységet használnak (a lerakott és kikelt peték arányból jól lehet következtetni az ovogenézisre gyakorolt anyai hatásra).

Kutatásunk annak megállapítására irányult, hogy vajon miként befolyásolja a szervezetben a Hsp70 stresszfehérjét kódoló gének száma annak termékenységet. Modellszervezetként a *Drosophila melanogaster* ecetmuslicát használtuk.

2. Felhasznált anyagok és módszerek

2.1. A muslicatenyésztésre használt táptalaj

A kísérleteinkben használt *Drosophila melanogaster* törzseinket standard kukoricalisztes táptalajon tartottuk fent és kereszteztük. Ez a Szegedi Biológiai Központban használt protokoll szerinti arányban tartalmazza a következőket (a mennyiség csökkenő sorrendjében): víz, kukoricaliszt, szaharóz, glükóz, élesztő, bakteriológiai agar, CaCl_2 (a kitinpáncél képződését segíti). A gombák és baktériumok elszaporodása ellen foszforsav-propionsav keveréket vagy Nipagint (metil-4-hidroxibenzoát) használtunk. Ezek a vegyszerek az adott táptalajbeli koncentrációnál (<0.5%) nincsenek semmiféle hatással a modellszervezetre.

2.2. A ecetmuslica (*Drosophila melanogaster*) törzsek

Kísérleteinkben az 1970-es években Gausz János és csapata által izolált mutáns *Drosophila* törzseket használtuk kiindulópontnak. Ezekből aztán különböző keresztezésekkel újabb mutáns törzseket izoláltunk. A mutációk jellegük szerint kromoszomális deficienciák, amelyek a 3. kromoszóma jobb karjának 87A7 (molekuláris térkép szerint: 87A2) és a 87C1 lókuszek közötti régióját érintik (2. ábra). A muslica kromoszómánkénti 5 darab hsp70 kópiája ezen a régió belül található: két hsp70 gén a 87A7 lókuszt köré, a másik három pedig a 87C1 lókuszt köré tömörül (3. ábra).

A 87C1 lókuszt körüli 3 darab hsp70 gén kiütését egy ún. *karmoisin* jellegű deficienciával (jelölése továbbiakban: *kar*) biztosítható. Nevét onnan kapta, hogy a deficiencia a hsp70 géneken kívül érint még egy szemszínt befolyásoló *kar* gént is. Előnye ennek a deficienciának, hogy a *kar* gén miatt fenotipikusan is jól észlelhető (4. ábra), hátránya, hogy csak körültekintéssel alkalmazható, mert érint három darab homozigóta letális és egy homozigóta nőstény steril gént. E gének a hsp70-esek és a *kar* gén között húzódnak meg. Viszont mivel hatásuk csak a deficiencia homozigóta állapotában érvényesül, egy normális vagy balanszer homológot használva a káros

fenotípus elnyomva marad. Ennek a deficienciának két változata van: a Df(3R) kar^{3J} , amely érinti a hsp70 géneket (a tulajdonképpeni hsp70 defficiencia) és a Df(3R) kar^{3L} , amely nem érinti a hsp70 géneket, csak tőlük a *kar*-ig tartó részt (kontrollként használható) (5. ábra)

A 87A7 lókuszt körüli 2 darab hsp70 gén kiütése egy 229 jelölésű deficiencia előállításával valósítható meg. Ez egy viszonylag pontos mutáció, a hsp70 géneken kívül csak egy kis részt érint, amely nem tartalmaz sem letális, sem nőstényszerűsítést okozó géneket.

Látható, hogy a 229 és a kar^{3J} mutációk kombinálásával előállítható olyan kromoszóma, amely nem hordoz hsp70 géneket.

A fentiekén kívül előállítottak olyan deficienciát is, amely egyszerre üti ki a 87A7 és a 87C1 lókusztaláló hsp-géneket. Ez nem érinti a *kar* régiót, viszont kiejti a két lókusztaláló szakaszt (5. ábra). Ezen a részen számos letális gén is található, viszont a letalitás megnyilvánulása takarható egy ép homológgal. E deficiencia jelölése Df(3R)T65, illetve Df(3R)P21 (ugyanazt a deficienciát jelentik, csak más módon voltak indukálva).

A fenti mutációkat hordozó muslica törzsek tehát a normális 10 darab hsp70 gén helyett, ennél kevesebbet hordoznak. Alább láthatóak felsorolva ezek a törzsek.

A rendelkezésére álló törzsek jelölése*	A hsp70 gének száma a genomban
Df(3R)229+ kar^{3J} /MRS	5
Df(3R)T65/MRS	5
Df(3R)P21/MRS	5
Sl5/TM3	7
Df(3R)229+ kar^{3L} /MKRS	8

* a TM3, MRS, MKRS jelölések a homológ balanszer kromoszómákra vonatkoznak

A mutáns törzsek a vad típusú Oregon-R törzsből izolálták. A hímeket EMS (etil-metil-szulfonát) kémiai mutagénnel kezelték (kivéve a P21 esetén, ahol a deficiencia transzpozon indukált) és az utódokat tesztelték a mutációkra a „Fly Pushing” szakjegyzetben is leírt protokoll szerint (Greenspan, 1997).

A fenti törzseket használva tervezett keresztezések során sikerült előállítanunk olyan mutánsokat, amelyek csupán csak két illetve három hsp70 gént hordoztak a genomjukban. A keresztezések során összehoztuk az S15, illetve a 229+kar^{3J} kromoszómákat a teljes hsp70-deficinciás T65 kromoszómával (6. és 7. ábra). A három teljes deficienciás közül ez utóbbi felel meg csak a többi deficienciás kromoszómával való társításra, ugyanis nem hordoz a többiekkel komplementer deficiens régiókat (kivéve a hsp70 lókuszokat), így nem kerülnek az érintett letális mutációk homozigóta állapotba.

Az így kapott hsp70 gén kópiaszámára transz-heterozigóta mutánsokat vetettük alá a peterakásos mérésnek.

Kézenfekvőnek tűnik, hogyha a törzsek az Oregon-R standard törzsből lettek izolálva, akkor ezt használjuk kontrollként. Viszont egy másik törzset, a fehér szemű W¹¹¹⁸-at szokták használni élettani kísérletekhez, genetikai háttérének paraméterei ilyen szempontból jobban ismertek. Ezért mi a kísérleteinkben ezt a törzset használtuk kontrollként. A különböző háttér miatt adódó esetleges termékenységbeli különbségek nem szignifikánsak, hiszen mindkét esetben ép hsp70 génszámú és egyéb génekre is ép alléllal rendelkező izogén törzsekről van szó.

2.3. A termékenység mérése

A ecetmuslicák termékenységének (fertilitásának) mérésére a Szegedi Tudományegyetem Orvosi Biológiai intézetében, Szabad János professzor laborjában rendszeresített módszert alkalmaztuk. A módszer alapjául egy kis műanyag csövecskéből és Petri-csészéből megfelelően összeállított eszköz, ún. petéztető rács („rack”) szolgált (8. ábra).

A mérés nőstények estében úgy zajlott, hogy a frissen kikelt adott genotípusú nőstényeket egyenként a rács egy-egy csövecskéjébe helyeztük. Melléjük rendszerint 2-2 standard W¹¹¹⁸ hímeket tettünk. A kontrollokat (W¹¹¹⁸ párokat) ugyanabba a rack-be helyeztük, mint a mérni kívánt mutánsokat.

Az így előkészített csövecske-rekesz alá Petri-csészében korommal feketére festett táptalajt helyeztünk, rajta csövecskénként egy-egy élesztőcseppel (lásd 8. ábra), amely a szülők táplálását szolgálta. Ezt a Petri-csészét naponta ugyanabban az órában

lecseréltük frissre. Ezt a folyamatot egy héten keresztül (a mérési periódus alatt) rendszeresen végeztük.

Az adott napon lecserélt Petri-csészén megszámoltuk, hogy a nőstények hány petét raktak le. Ugyanezen a Petri-csészén egy nappal később megszámoltuk, hogy az adott petéknek hány százaléka kelt ki, illetve, hogy a ki nem keltek (zápok) közül hány volt fehér és hány barnult be (ez utóbbiaknál már elkezdődött a cellularizáció mielőtt elpusztultak volna¹). A kapott értékeket táblázatba vezettük.

Az egyes nőstényeket termékenység szempontjából két értékkel jellemeztük:

1. *Összpeteszám*: a mérési periódus alatt lerakott peték összege
2. *Átlagos fertilitás*: a mérési periódus egyes napjain mért kikelési arányok (kikelt peték/lerakott peték $\times 100\%$) átlaga. Ez utóbbi érték bevezetése azért is helyes, mert figyelembe veszi az egyes napokon lerakott peték számát is, így kevésbé torzít, mint az *összfertilitás* (összes kikelt pete/összpeteszám $\times 100\%$).

Az *ecetmuslica* életciklusát figyelembe véve a mérési periódus hét napos időtartama optimálisnak bizonyult. A két napos *muslica* nőstények pont a mérések elindításakor válnak teljesen ivaréretté, kezdenek el petézni, illetve a 5.-6. napon érik el peterakásuk maximumát, ami napokon keresztül konstans marad, majd hanyatlani kezd (lásd még Bate és mtsai, 1993). Az általunk beállított időszak pontosan a petezés kezdetétől az állandó petézési szint eléréséig terjed, így a kapott eredményekkel helytállóan jellemezhetőek az adott genotípusú nőstények termékenység szempontjából.

A hímeket úgy jellemeztük termékenység szempontjából, hogy frissen kikelt W^{1118} nőstényeket petéztettünk az adott genotípusú hímek társaságában. A fentiekben leírt paramétereket vizsgáltuk itt is. A hímek termékenysége feltehetően nem a nőstények összpeteszámát, hanem a kikelési arányt (ezáltal az átlagos fertilitást) befolyásolja (a peték megtermékenyítésén keresztül).

¹ A zápok ilyen módon való elkülönítésének nincs jelentősége ezen kutatás keretében. A későbbiekben, más kutatási tervek keretében szeretnénk az itt kapott eredményeket felhasználni.

2.4. A szaporítókészülék anatómia vizsgálata

Ahhoz, hogy a termékenység (vagy terméketlenség) anatómiai hátterét megvizsgáljuk, a nőstények petefészket (ováriumát) kiboncoltuk, majd egy DAPI (4,6-diamino-2-fenilindol) nevű DNS-festékkal láthatóvá tettük a sejtmagvakat és fluoreszcens mikroszkópban vizsgáltuk őket (úgy fluoreszcens, mint optikai módban).

A petefészek kiboncolásához alkoholban elaltatott nőstényeket használtunk, melyek már előzőleg túlestek a peterakásos mérésen. A boncolást boncolócsipeszekkel boncolómikroszkóp alatt végeztük. A vizsgálati anyagot kis felületi feszültséggel rendelkező PBS-oldatban úsztatva boncoltuk.

A kiboncolt petefészkeket 20-30 perces fixálás és 2 órás PBST-vel való mosás után 3 órán keresztül festettük DAPI-val. Ezután újabb mosás következett, majd az így módon előkészített petefészkekből tárgylemezre mikroszkópi preparátumot készítettünk.

2.5. Az adatok statisztikai elemzése

A peterakásos mérés adatainak biostatisztikai elemzéséhez a Microsoft Excel program Adatelemzés programcsomagját használtuk. A kapott eredményeket táblázat formájában jelenítettük meg. A nullhipotézist (hogy a vizsgált csoportok nem különböznek lényegesen egymástól) akkor fogadtuk el, hogyha a P érték 0,05-nél nagyobb volt. A P értéket a mellékletekben található táblázatoknál a „P (T<=t) two-tail” mutatja.

3. Eredmények

3.1. A termékenység mérésének eredményei

A peterakásos mérési periódus során az összegyűjtött adatokból² első lépésként arra vonatkozóan végeztünk statisztikai elemzést, hogy a csak az egyik kromoszómájukon deficienciát hordozó nőtények között van-e annak jelentősége, hogy az ép homológ normál (vad típusú, + -al jelölve) vagy balanszer kromoszóma. Erre vonatkozóan két mintás T-próbákat végeztük az Sl5/+ és Sl5/MRS illetve a Df(3R)229+kar^{3L}/+ és Df(3R)229+kar^{3L}/MKRS genotípusú nőtények termékenységére vonatkozóan (I. és II. táblázat). 5% szabadsági foknál ($\alpha = 0,05$) nem mutatkozott szignifikáns különbség a normál illetve balanszer kromoszómás, de ugyanolyan deficienciát hordozó nőtények termékenysége között. Ebből arra következtethetünk, hogy a vad típusú és a balanszer kromoszómákon található ép hsp70 gén expressziója között nincs jelentős különbség. Ennek az elemzésnek az alapján a + és a balanszeres minták értékeit egyesítettük egy mintában és a továbbiakban csak vad típusként (+) jelöltük.

A továbbiakban egyenként összehasonlítottuk az Sl5/+, Df(3R)229+kar^{3L}/+ és Df(3R)T65/+ heterozigóták adatait a W¹¹¹⁸ kontroll adataival (III., IV. és V. táblázat). 5% szabadsági foknál ($\alpha = 0,05$) egyik genotípus termékenysége sem különbözött lényegesen a kontrol nőtényekétől. Ezt az eredményt egy mind a négy mintát magába foglaló egyfaktoros varianciaanalízis (ANOVA) is megerősítette (VI. táblázat).

A csupán két, illetve három hsp70 génnel rendelkező Sl5/Df(3R)T65 és Df(3R)229+kar^{3L}/ Df(3R)T65 transz-heterozigóta törzsek alacsony termékenysége szemmel látható volt és ezt a biostatistikai adatelemzés is megerősítette. A két genotípust egyenként kétmintás T-próbával összehasonlítottuk a W¹¹¹⁸ kontrollal (VII. és VIII. táblázat). 5% szabadsági foknál ($\alpha = 0,05$) mindkét genotípus termékenysége lényegesen különbözött a W¹¹¹⁸ kontrollétól.

Összehasonlítottuk a két transz-heterozigóta genotípus termékenységét is egymással (IX. táblázat). A kétmintás T-próba 5% szabadsági foknál ($\alpha = 0,05$) azt

² Az konkrét számokat nem részletezzük külön, azok a statisztikai elemzések táblázataiban találhatók (lásd mellékletek)

mutatta, hogy a két transz-heterozigóta genotípus termékenysége nem különbözik lényegesen egymástól.

Az egyes genotípusok termékenysége közti különbséget a 9. ábra szemlélteti grafikusan. Ahhoz, hogy az összpetszámot és az átlagos fertilitást egy grafikonon ábrázolhassuk, az előbbit is százalékban kell kifejeznünk. A W^{1118} kontroll egyedeinél mért összpetszámok átlagát, 202,5-öt vettük 100%-nak és ennek függvényében fejeztük ki a többit is.

A grafikonon látható, hogy a hsp70 gének számának csökkenésével csökken a lerakott peték száma is. Az átlagos fertilitás esetében nem ilyen egyértelmű ez a csökkenés. Hogy a termékenység változását a szemléletesség kedvéért egy értékben kifejezhessük, bevezettünk egy új értéket, a *számolt termékenységi mutatót*. Ez az érték az összpetszám és az átlagos fertilitás számtani középarányosa. Ezeket az értékeket grafikusán ábrázolva (10. ábra) jól látható, hogy a termékenység abszolút értelemben csökken a hsp70 gének számának csökkenésével. Ez a csökkenés a transz-heterozigóta (kettő és három hsp70 gén), illetve a heterozigóta (öt, hét és nyolc hsp70 gén) csoportok között jelentős, és csoportokon belül is némiképp csökken.

A grafikonon megfigyelhető az is, hogy a 7 és 8 hsp70 génkópiával rendelkező mutánsok termékenysége nem szignifikánsan, de nagyobb mint a 10 gén-kópiát hordozó kontrollé. Ez a jelenség azzal magyarázható, hogy a kontroll csoport más ún. genetikai háttérrel rendelkezik. Viszont ez a gének számával nem hozható kapcsolatban. A jelenség magyarázata inkább statisztikusan magyarázható. A W^{1118} populáció az egész genom tekintetében sokkal diverzebb, az egyes egyedek termékenysége nagyobb szórást mutat, mint az a hsp70 mutánsok esetében van.

A termékenységi tesztet elvégeztük az SL5/Df(3R)T65 mutáns hímek esetében is. Azért csak ezt a genotípust teszteltük, mert ez mutatta a legkisebb termékenységet. Arra voltunk kíváncsiak, hogy ez a genotípus befojásolja-e a hímek termékenységét. A két darab hsp70 gént hordozó hímek társaságában petéztettünk normál W^{1118} nőstényeket. A kétmintás T-próba azt mutatta, hogy a mutáns és a normál hímek társaságában petéztetett normál nőstények a termékenység szempontjából nem különböztek (X. táblázat). Az értékeket grafikusán megjelenítve látható, hogy az míg összpetszámban csekély a különbség, addig a peték kikelési aránya (az átlagos fertilitás) azért sokkal kisebb az SL5/Df(3R)T65 genotípusú apák csoportjában (11. ábra). Ebből feltételezhetjük azt, hogy

a nőtények teljesítették a genotípusukhoz „illő” teljesítményt, normál számú petét raktak le. E peték azonban kisebb arányban voltak megtermékenyítve az *Sl5/Df(3R)T65* hímek esetében, így azok kisebb arányban keltek ki. A hímek termékenységevel kapcsolatos eredményeink még csak részeredmények, eddig a nőtények termékenységevel kapcsolatban gyűjtöttünk csak elegendő mennyiségű adatot. Kutatásunk későbbi szakaszában nagyobb mintaszámmal megismételjük a kísérletet a hímekre nézve, így feltehetően egyértelműbb eredményt kapunk.

3.2. Az anatómiai vizsgálatok eredményei

A petefészek kiboncolása és mikroszkópos vizsgálata hozzájárult annak megértéséhez, hogy mi állt a *hsp70* mutánsok terméketlenségének hátterében. A legalacsonyabb (szinte 0) termékenységet mutató, *Sl5/Df(3R)T65* genotípusú nőtényeket vizsgáltuk.

A *Drosophila melanogaster* petefészkét (az ováriumot) gyöngyfüzérhez hasonló ún. ovariolumok építik fel (12. ábra). Az ovariolumok egy ún. *fejlődési sort alkotó* különböző fejlődési stádiumban levő petékből állnak. Az ovariolum végén van a lerakás előtt álló *egyetlen* kifejlett, érett pete. Ez kibújik az öt övező tápláló hártya (follikuláris sejtréteg) közül, majd elindul a hüvely felé, ahol az előzetesen felvett (az ún. spermatékában tárolt) spermiumok által megtermékenyül, majd lerakódik. Csak ezután érik be teljesen a fejlődési sorban az öt követő következő pete.

A mutáns nőtények petefészkét összehasonlítva a kontroll (úgy *W¹¹¹⁸*, mint Oregon-R) nőtények petefészkével, megdöbbenve láttuk, hogy a mutánsok petefészkében ovariolumonként nem csupán egyetlen, hanem több (3-5) kifejlett, lerakásra megérett pete volt (13. ábra). Ezek a lerakatlan érett peték egymáshoz voltak nyomulva, össze voltak tapadva. A felhalmozódott peték miatt a nőtények potroha jól láthatóan meg volt duzzadva (15. ábra).

A visszamaradt, lerakatlan petéket nagyobb nagyítással, fluoreszcens módban is megvizsgáltuk. A DAPI festés miatt jól láthatóan fluoreszkálnak a petéket tápláló follikuláris sejtréteg magjai. Azt tapasztaltuk, hogy az összetapadt kifejlett peték mindegyikén jelen volt még a follikuláris sejtréteg, nem vált le, mint ahogy a lerakás előtt

álló petéknél szokott (14. ábra). Ráadásul ez a hártya nem egyenként borította az összetapadt petéket, hanem folytonos volt rajtuk. A meglévő és folytonos follikuláris sejtréteg alapján fetételezhető, hogy a nőstény ezeket a petéket később sem rakta volna le.

4. Következtetések és további célkitűzések

A különböző számú hsp70 géneket hordozó *Drosophila melanogaster* ecetmuslicák termékenysége mérése alapján elmondhatjuk, hogy a hsp70 stresszfehérje gének száma befolyásolja a termékenységet. A 70 kDa tömegű stresszfehérjét kódoló gének számának csökkenésével csökken az egyedek termékenysége is, tehát ezen gének száma és a fertilitás pozitív korrelációt mutat.

Ez a következtetésünk egyelőre csak a nőstények termékenysége vonatkozásán van statisztikailag is bizonyítva. A hsp70 és a hímek termékenysége közötti kapcsolat tisztázása további mérések elvégzését igényli, mert egyelőre kevés adat áll rendelkezésre. Már folyamatban van a méréshez szükséges törzsek kikeresztezése.

A anatómiai vizsgálatok eredményei alapján következtethetünk arra, hogy milyen konkrét fiziológiai háttere volt a tapasztalt terméketlenségnek. A vizsgált mutáns nőstények petefészkeiben a normálhoz hasonlóan kifejlődtek a peték, tehát nem az ovogenézis valamelyik szakaszában történt hiba. A kontrollal ellentétben viszont a mutánsoknál a petéknek csak jelentéktelen százaléka rakódott le. Az érett peték felhalmozódtak, összetömörültek. Nem vált le róluk a petéket tápláló follikuláris sejtréteg, ezért feltehetően a peték később sem rakódtak volna le.

A felhalmozódott petéket eddigi ismereteink alapján két módon magyarázhatjuk, anatómiai elváltozásokat, illetve idegrendszeri-etológiai tényezőket figyelembe véve.

Egyik feltevésünk, hogy a kevesebb hsp70 gén miatt kisebb mennyiségben expresszáldott Hsp70 stresszfehérje következtében valamilyen rendellenességek léphettek fel a szaporító készülékben. Ismeretesek olyan mutációk, amelyek a belső szervrendszerek szimmetria viszonyait képesek megváltoztatni és olyan elfordulásokat (torziókat) idézhetnek elő a petevezetékben, ami miatt a nőstények terméketlenek lesznek. Ismerve a Hsp70 stresszfehérje mutációkat elnyomó hatását, feltételezhető, hogy e fehérjének a szervezetben levő alacsonyabb szintje ilyen szimmetriaviszonyokat módosító géneket engedett megnyilvánulni. E feltevés helyességének azonban kicsi a valószínűsége, hiszen ez a nőstények teljes sterilitásával járna együtt. A mi esetünkben viszont csak a termékenység nagy mértékű lecsökkenését tapasztalhattuk, a nőstények a mérési periódus alatt nagyon ritkán ugyan de raktak le petéket. Ráadásul a mikroszkópos képek is ép nemi készüléket mutattak az Sl5/Df(3R)T65 mutáns nőstények esetében (16. ábra).

Van egy másik anatómiai magyarázat is, ami szintén összefüggésbe hozható a hsp70 génekkel. A Hsp70 stresszfehérje részt vesz olyan fehérje-transzport folyamatokban, melyek a csillók és ostorok mozgását segítik elő. Feltehetően a mutáns nőstényeknél az ivarjáratot bélelő nyálkahártyának a peték mozgását segítő csillói szenvedtek károsodást, elégtelenül látják el feladatukat és ennek következménye az alacsonyabb termékenység. Ez sokkal valószínűbb magyarázat, mint az előző és megengedi az esetenként lerakott petéket is. Emlősök petevezetékében már mutattak ki összefüggést a Hsp-szint és a csillómozgások között (Sephens és Lemieux, 1999). Ez megerősíti feltevésünket, amennyiben analógia áll fent a muslica és az emlősök ivarszervei között. Ahhoz, hogy a hipotézisünket igazoljuk, további vizsgálatokat tervezünk. Először is megnézzük Western-blott-on a Hsp70 expressziós szintet a mutáns nőstényekben. A továbbiakban újabb fluoreszcens mikroszkópos vizsgálatokat is tervezünk, melyben megnéznénk maguknak a csillóknak a morfológiáját, sűrűségét és aktivitását. Értesüléseink szerint elgondolásunk megvalósítható konfokális mikroszkóp és fluoreszcens tubilin festés segítségével.

A harmadik és egyben legérdekesebb, idegrendszeri-etológia magyarázatot egy másik megfigyelés alapján vetjük fel. A természetben ugyanis a muslica nőstények kedvezőtlen körülmények között (pl. drasztikus hőmérsékletváltozás) képesek néhány napig visszatartani a petéjüket és csak később lerakni, amikor már a káros hatás megszűnik. Feltételezésünk szerint ez is állhat a kevesebb hsp70 génnel rendelkező muslica nőstényeink csökkent peterakása mögött. Ezeknek az állatoknak a szervezetében feltehetően alacsonyabb a Hsp70 szint, ezért érzékenyebbek a környezet mindennapi stresszeivel szemben. Lehet, hogy a normál környezeti feltételeket (25°C, 60% páratartalom) is folyamatosan stresszként élik meg, ezért visszatartják petéiket, a kontrollokéval elentétben, amelyek jól petéznek. Ez az elgondolás megmagyarázza az alacsonyabb peteszámot, viszont nem magyarázza a megmaradt follikuláris sejtréteget és a peték rossz kikelési arányát. E hipotézisünk igazolására (vagy elvetésére) további kísérleteket tervezünk. Összehasonlítjuk a hsp70 mutánsok és a petéjüket visszatartó stresszelt normál egyedek petefészkét. A továbbiakban a méréseket megismételjük egy kissé magasabb, 29°C-os hőmérsékleten, abból a célból, hogy megnézzük vajon a mutánsok peterakása javul-e (ez is az előbbi elméletünket támasztaná alá).

Végső következtetésként elmondhatjuk, hogy a hsp70 génnek száma befolyásolja a termékenységet, pozitívan korrelál azzal. Hogy milyen konkrét mechanizmusok útján történik mindez, arra vannak elméleteink, de ezek bizonyítása további folyamatban levő kísérleteink tárgyát képezik.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton köszönetünket szeretnénk kifejezni témavezetőinknek, dr. Kósa Ferencnek, dr. Sőti Csabának és prof. Cornelia Craciunasnak, hogy tanácsaikkal, biztatásaikkal hozzájárultak kutatásaink elvégzéséhez.

Köszönjük Csermely Péter professzornak, hogy segítette a megfelelő emberekkel való kapcsolatfelvételt és a stresszfehérjékkel kapcsolatban tanácsokat adott.

Hálával tartozunk Szabad János professzornak, hogy kutatásunk egyes fázisaiban szegedi laborjában biztosította a kísérletekhez szükséges technikai feltételeket, valamint tanácsokkal halmozott el az *ecetmuslica* anatómiáját és genetikáját illetően.

Végül, de nem utolsó sorban szeretnénk köszönetet mondani dr. Gausz Jánosnak, dr. Erdélyi Miklósnak és dr. Szidonya Jánosnak a rendelkezésünkre bocsájtott *Drosophila melanogaster* *ecetmuslica* törzsekért, valamint hasznos tanácsaikért.

Irodalomjegyzék

1. Bate, M. és Arias, A.M. (1993) The Development of *Drosophila melanogaster*. CSHL Press.
2. Borash, D.J. és Ho, G. T. (2001) Patterns of selection: stress resistance and energy storage in density-dependent populations of *Drosophila melanogaster*. Journal of Insect Physiology.
3. Christians, E. és Benjamin, I.J. (2005) A murine world without HSFs: meeting reeport. Cell stress & chaperones 10(4): 265-267.
4. Csermely, P. (2001) Sresszfehérjék. Vince Kiadó. Tudomány-Egyetem sorozat.
5. Gausz, J. és mtsai (1979) Genetic characterization of the 87C1 region of the third chromosome of *Drosophila melanogaster*. Genetics.
6. Gausz, J. és mtsai (1981) Screen for mutations in the 87A7 locus. Cikktöredék
7. Greenspan, R.J. (1997) Fly Pushing. CSHL Press.
8. Jedlicka, P. és mtsai (1997) Multiple function of *Drosophila* heat shock transcription factor *in vivo*. The EMBO Journal.16 (9): 2452-2462.
9. Kovács, L. és Jipa, A. (2004) A tömegstressz hatása a *Drosophilák* ellenálló képességére és genetikai stabilitására. Csűrös István emlékversenyen bemutatott dolgozat
10. Kovács, L. és Csermely, P. (2006) Crowding Stress. In: Encyclopedia of Stress. (szerk.: G. Fink, 2nd Ed.) Academic Press. In press
11. Ritossa, F. (1962) A new puffing pattern induced by heat shock and DNP in *Drosophila*. Experientia.18:571–573
12. Stephens, R.E. és Lemieux, N.A. (1999) Molecular chaperones in cilia and flagella: implications for protein turnover. Cell Motil Cytoskeleton. 44(4):274-83.
13. Szabad, J. és Seprényi, Gy. (2002) Petevizsgálat genetikai boncolással. Élet és Tudomány. 57(41): 1292-1294.
14. Xiao, X.Z. és mtsai (1999) HSF1 is required for extra-embryonic development, postnatal growth and protection during inflammatory responses in mice. The EMBO Journal. 18(21): 5943-5952.

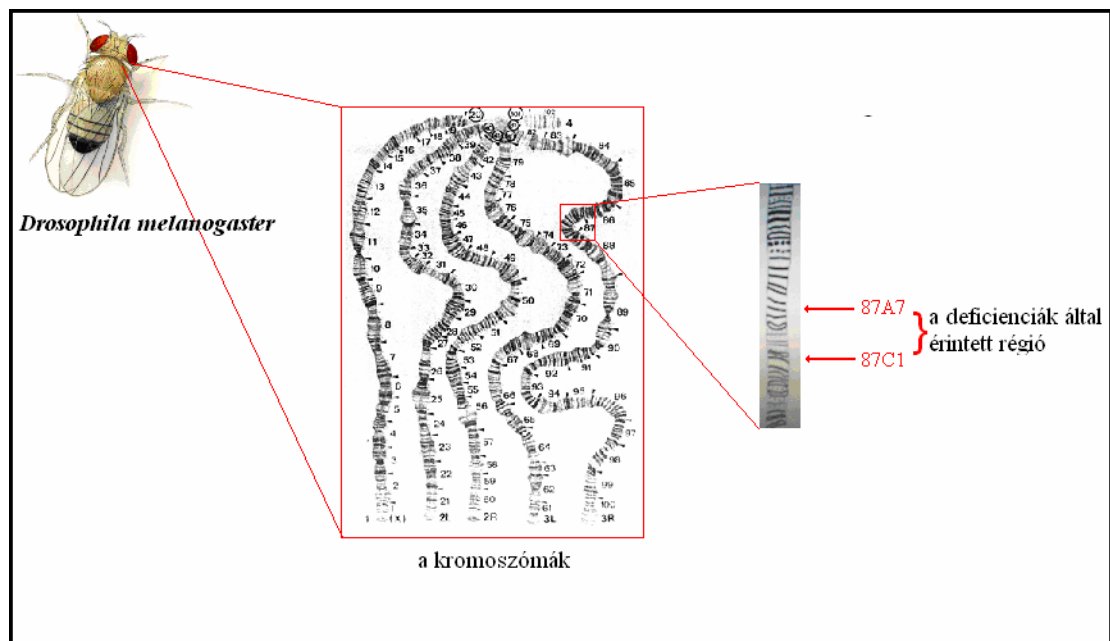
Mellékletek

1. ábra



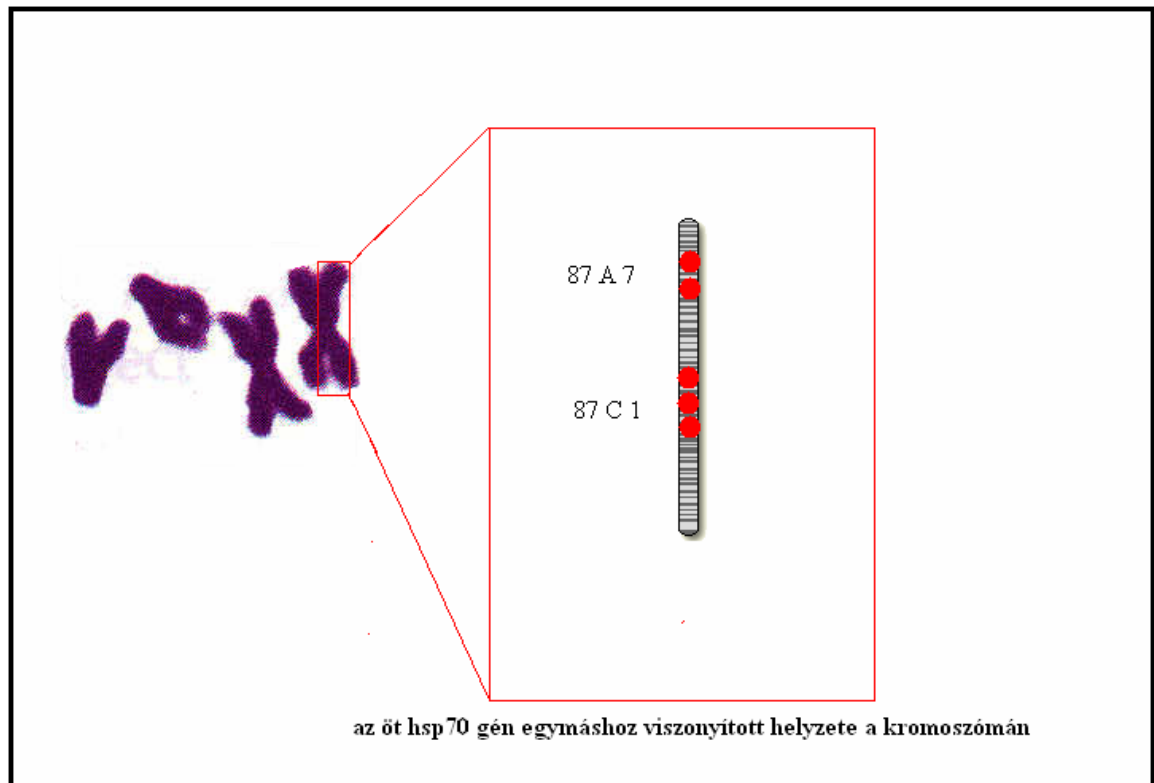
A Hsp70 stresszfehérje számítógépes modellje (az RCSB Fehérje Adatbank alapján).

2. ábra



A *Drosophila melanogaster* és kromoszómái. Az 3. kromoszóma jobb karjának 87A7 és 87C1 lókuszai közti régió képezte vizsgálatunk tárgyát. E lókuszok között találhatóak a hsp70 gének (a FlyBase adatbázis után, módosítva; megjegyzés: a képen ábrázolt kromoszóma egy óriáskromoszóma, amelyet lárvák nyálmirigyéből pereparálhatunk).

3. ábra



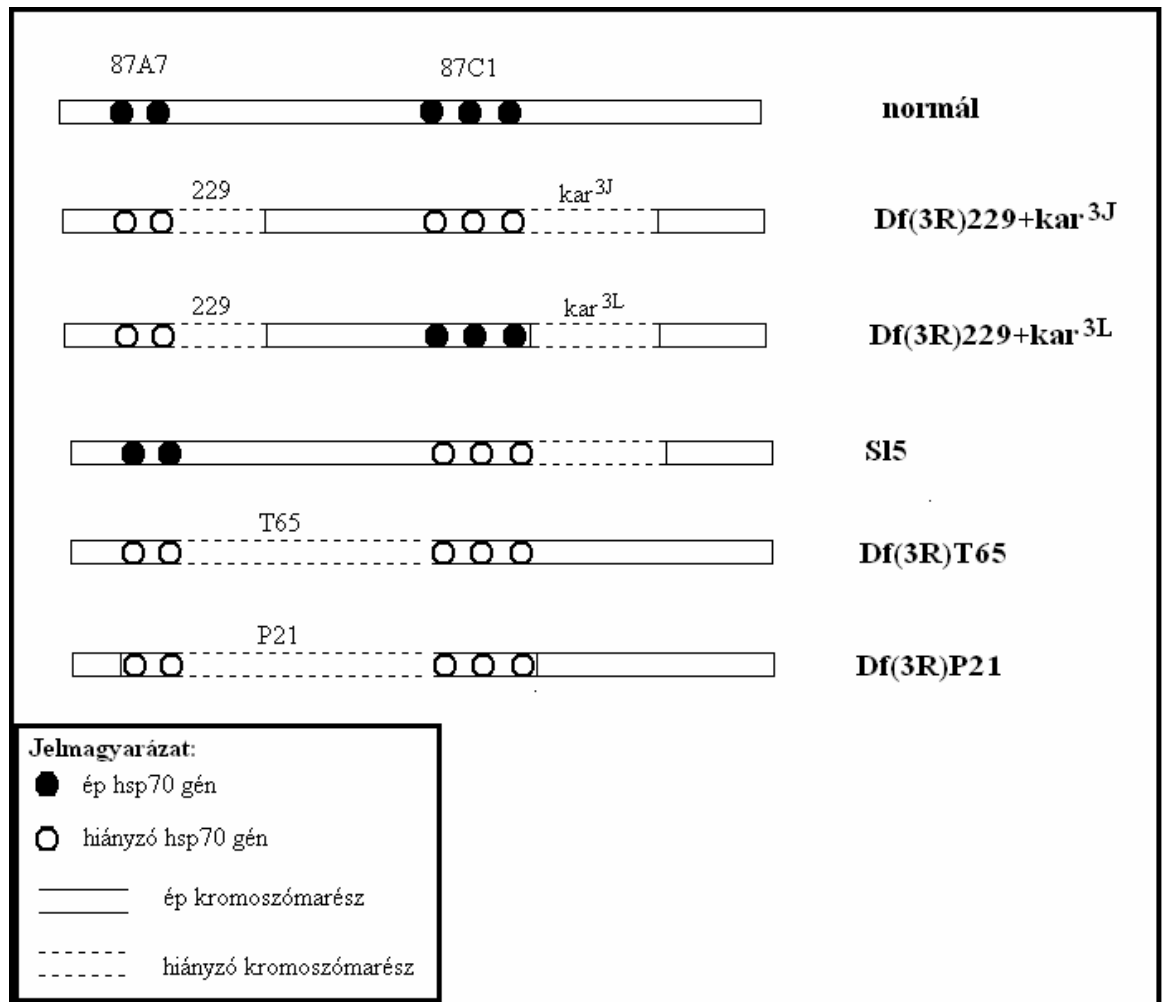
Az öt darab hsp70 gén egymáshoz viszonyított elhelyezkedése a 3. kromoszómán. Két darab hsp70 gén a 87A7 lókuszt körül tömörül, a másik három pedig a 87C1 lókuszt körül. A géneket piros pontok jelképezik (a BBC után módosítva; megjegyzés: az ábra csak az egymáshoz viszonyított elhelyezkedést szemlélteti, nem méretarányos).

4. ábra



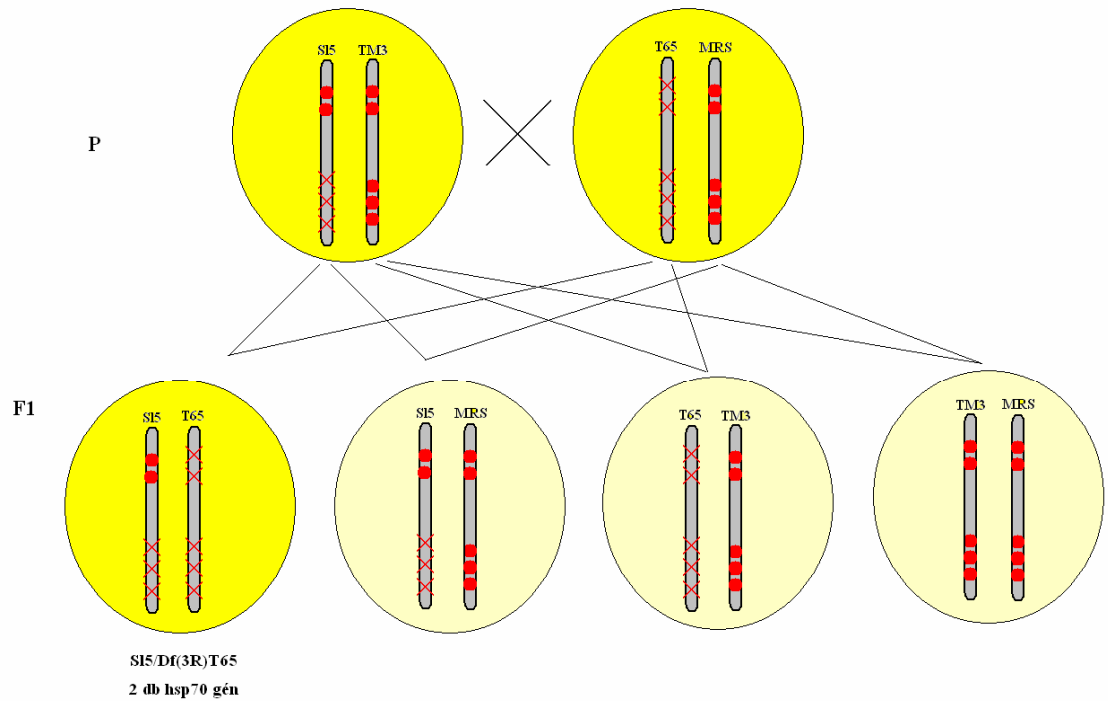
A szemszínt befolyásoló *karmoisin* gén fenotipikus megnyilvánulása. Az ábrán a felső, világosabb piros szemű egyed hordozza a *kar* gént, az alsó sötétebb szemű egyedből pedig hiányzik (a szerzők felvétele).

5. ábra



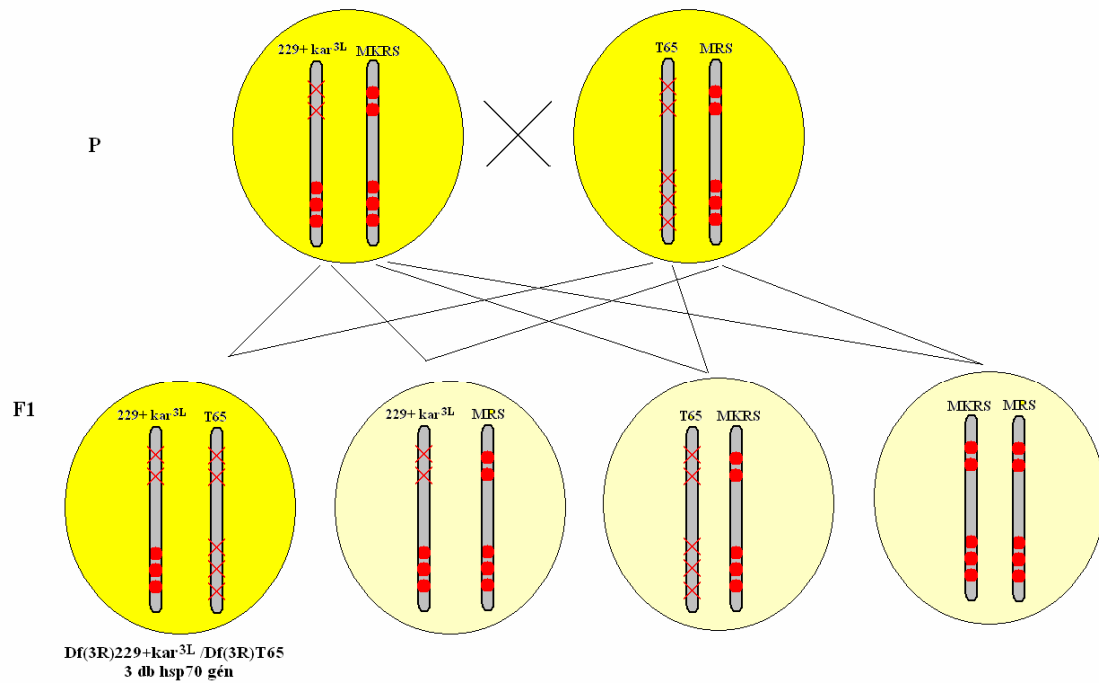
A kísérleteinkben felhasznált kromoszómatípusok vázlata. Két ilyen kromoszóma egy állatban való kombinálásakor ügyelni kellett arra, hogy a hsp70 géneken kívül hiányzó részek ne kerüljenek fedésbe egymással (a letális gének miatt). Ez különösképpen fontos a *kar* deficienciák esetén. Ezért a többi kromoszómát csak a Df(3R)T65 típusúval kombináltuk. (megj.: a balanszer kromoszómák – TM3, MRS, MKRS – vázlata a normál kromoszómáéhoz hasonló).

6. ábra



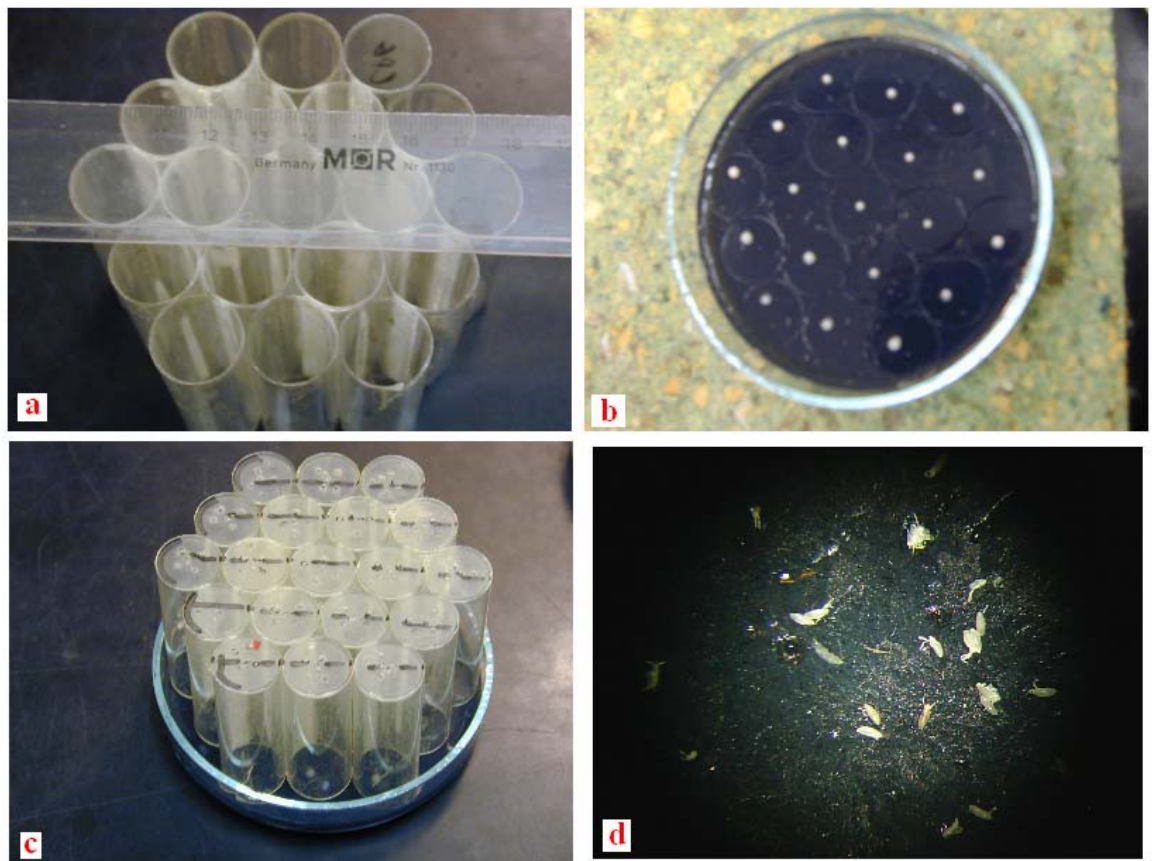
A csak két darab hsp70 génnel rendelkező, SI5/Df(3R)T65 genotípusú egyedek eléréséhez szükséges keresztezés. Ezeket az állatokat könnyen felismerhettük, mert nem mutatták a balanszer kromoszómákhoz kötött jelző tulajdonságokat (rövid szőr, fűrészes szárny), ellentétben a balanszer kromoszómákat (itt TM3 és MRS) hordozó utódokkal (megjegyzés: a pálcikák a kromoszómákat, a piros pöttyök az ép hsp70 géneket, a piros X-ek a hiányzó hsp70 géneket jelképezik).

7. ábra



A csak 3 darab hsp70 génnel rendelkező, Df(3R)229+kar^{3L}/Df(3R)T65 genotípusú egyedek eléréséhez szükséges keresztezés. Ezeket az állatokat könnyen felismerhettük, mert nem mutatták a balanszer kromoszómákhoz kötött jelző tulajdonságokat (rövid szőr), ellentétben a balanszer kromoszómákat (itt MKRS és MRS) hordozó utódokkal (megjegyzés: a pálcikák a kromoszómákat, a piros pöttyök az ép hsp70 géneket, a piros X-ek a hiányzó hsp70 géneket jelképezik).

8. ábra



A petéztető rács („rack”). a: a rácsot alkotó, éterrel összeragasztott kis műanyag csövecskék. b: a korommal feketére festett táptalaj, rajta a kis fehér pöttyök élesztő cseppek, amellyel a szülők táplálkoznak. c: egy üzembehelyezett petéztető rács. d: a táptalajon mikroszkópon keresztül látszó fehér peték, amelyeket meg kell számolni (a szerzők felvételei).

I. táblázat

Az SI5/+ és SI5/MRS genotípusok összehasonlítása

F-Test Two-Sample for Variances Osszpeteszam			F-Test Two-Sample for Variances Atlagos fertilitas		
	SI5 +	SI5 MRS		SI5 +	SI5 MRS
Mean	261.75	245.3333333	Mean	97.64	86.89
Variance	146.25	21808.33333	Variance	0.4194	179.5719
Observations	4	3	Observations	4	3
df	3	2	df	3	2
F	0.0067062		F	0.0023356	
P(F<=f) one-tail	0.0009939	0.001987727	P(F<=f) one-tail	0.0002063	0.000412547
F Critical one-tail	0.1046891		F Critical one-tail	0.1046891	
t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances Osszpeteszam			t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances Atlagos fertilitas		
	SI5 +	SI5 MRS		SI5 +	SI5 MRS
Mean	261.75	245.3333333	Mean	97.64	86.89
Variance	146.25	21808.33333	Variance	0.4194	179.5719
Observations	4	3	Observations	4	3
Hypothesized Mean Difference	0		Hypothesized Mean Difference	0	
df	2		df	2	
t Stat	0.1920635		t Stat	1.388257	
P(T<=t) one-tail	0.432713		P(T<=t) one-tail	0.1497363	
t Critical one-tail	2.9199856		t Critical one-tail	2.9199856	
P(T<=t) two-tail	0.865426		P(T<=t) two-tail	0.2994725	
t Critical two-tail	4.3026527		t Critical two-tail	4.3026527	

II. táblázat

A Df(3R)229+kar^{3L}/+ és a Df(3R)229+kar^{3L}/MKRS genotípusok összehasonlítása

F-Test Two-Sample for Variances			F-Test Two-Sample for Variances		
Osszpeteszam			Atlagos fertilitas		
	229+KAR3L +	229+KAR3L MKRS		229+KAR3L +	229+KAR3L MKRS
Mean	211.6666667	359.3333333	Mean	95.80666667	79.02333333
Variance	1716.333333	892.3333333	Variance	2.616033333	516.803033
Observations	3	3	Observations	3	3
df	2	2	df	2	2
F	1.923421741		F	0.005061954	
P(F<=f) one-tail	0.342064912	0.684129824	P(F<=f) one-tail	0.00503646	0.01007292
F Critical one-tail	19		F Critical one-tail	0.052631579	
t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances			t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances		
Osszpeteszam			Atlagos fertilitas		
	229+KAR3L +	229+KAR3L MKRS		229+KAR3L +	229+KAR3L MKRS
Mean	211.6666667	359.3333333	Mean	95.80666667	79.02333333
Variance	1716.333333	892.3333333	Variance	2.616033333	516.803033
Observations	3	3	Observations	3	3
Pooled Variance	1304.333333		Hypothesized Mean Difference	0	
Hypothesized Mean Difference	0		df	2	
df	4		t Stat	1.275498358	
t Stat	-5.007648125		P(T<=t) one-tail	0.165125287	
P(T<=t) one-tail	0.003725019		t Critical one-tail	2.91998558	
t Critical one-tail	2.131846782		P(T<=t) two-tail	0.330250574	
P(T<=t) two-tail	0.007450038		t Critical two-tail	4.30265273	
t Critical two-tail	2.776445105				

III. táblázat

A kontroll és az SI5/+ genotípus összehasonlítása

F-Test Two-Sample for Variances Osszpeteszam			F-Test Two-Sample for Variances Atlagos fertilitas		
	<i>Kontrol</i>	<i>SI5 +</i>		<i>Kontrol</i>	<i>SI5 +</i>
Mean	202.5	254.7142857	Mean	75.999	93.03285714
Variance	7531.8333	7419.571429	Variance	1169.4292	93.08485714
Observations	10	7	Observations	10	7
df	9	6	df	9	6
F	1.0151305		F	12.563044	
P(F<=f) one-tail	0.5123864	0.975227278	P(F<=f) one-tail	0.0029995	0.005998979
F Critical one-tail	4.0990155		F Critical one-tail	4.0990155	
t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances Osszpeteszam			t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances Atlagos fertilitas		
	<i>Kontrol</i>	<i>SI5 +</i>		<i>Kontrol</i>	<i>SI5 +</i>
Mean	202.5	254.7142857	Mean	75.999	93.03285714
Variance	7531.8333	7419.571429	Variance	1169.4292	93.08485714
Observations	10	7	Observations	10	7
Pooled Variance	7486.9286		Hypothesized Mean Difference	0	
Hypothesized Mean Difference	0		df	11	
df	15		t Stat	-1.492587	
t Stat	1.2245092		P(T<=t) one-tail	0.0818303	
P(T<=t) one-tail	0.119822		t Critical one-tail	1.7958848	
t Critical one-tail	1.7530503		P(T<=t) two-tail	0.1636606	
P(T<=t) two-tail	0.239644		t Critical two-tail	2.2009852	
t Critical two-tail	2.1314495				

IV. táblázat

A kontroll és a Df(3R)229+kar^{3L}/+ genotípus összehasonlítása

F-Test Two-Sample for Variances Osszpeteszam			F-Test Two-Sample for Variances		
	<i>Kontrol</i>	<i>229+KAR3L +</i>		<i>Kontrol</i>	<i>229+KAR3L +</i>
Mean	202.5	285.5	Mean	75.999	87.415
Variance	7531.833333	7585.1	Variance	1169.429188	292.27171
Observations	10	6	Observations	10	6
df	9	5	df	9	5
F	0.99297746		F	4.001171334	
P(F<=f) one-tail	0.46609844	0.93219688	P(F<=f) one-tail	0.070526733	0.14105347
F Critical one-tail	0.287219426		F Critical one-tail	4.772465613	
t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances			t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances		
	<i>Kontrol</i>	<i>229+KAR3L +</i>		<i>Kontrol</i>	<i>229+KAR3L +</i>
Mean	202.5	285.5	Mean	75.999	87.415
Variance	7531.833333	7585.1	Variance	1169.429188	292.27171
Observations	10	6	Observations	10	6
Pooled Variance	7550.857143		Pooled Variance	856.15866	
Hypothesized Mean Difference	0		Hypothesized Mean Difference	0	
df	14		df	14	
t Stat	1.849675735		t Stat	0.755531311	
P(T<=t) one-tail	0.042790467		P(T<=t) one-tail	0.231226626	
t Critical one-tail	1.761310115		t Critical one-tail	1.761310115	
P(T<=t) two-tail	0.085580933		P(T<=t) two-tail	0.462453253	
t Critical two-tail	2.144786681		t Critical two-tail	2.144786681	

V. táblázat

A kontroll és a Df(3R)T65 genotípus összehasonlítása

F-Test Two-Sample for Variances			F-Test Two-Sample for Variances		
	Osszpeteszam			Atlagos fertilitas	
	<i>T65 +</i>	<i>Kontrol</i>		<i>T65 +</i>	<i>Kontrol</i>
Mean	160.3333	202.5	Mean	76.54	75.999
Variance	170.3333	7531.833333	Variance	108.0196	1169.429188
Observations	3	10	Observations	3	10
df	2	9	df	2	9
F	0.022615		F	0.09237	
P(F<=f) one-tail	0.022306	0.04461189	P(F<=f) one-tail	0.087379	0.174757401
F Critical one-tail	0.051587		F Critical one-tail	0.051587	
t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances			t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances		
	Osszpeteszam				
	<i>T65 +</i>	<i>Kontrol</i>		<i>T65 +</i>	<i>Kontrol</i>
Mean	160.3333	202.5	Mean	76.54	75.999
Variance	170.3333	7531.833333	Variance	108.0196	1169.429188
Observations	3	10	Observations	3	10
Hypothesized Mean Difference	0		Pooled Variance	976.4456	
df	10		Hypothesized Mean Difference	0	
t Stat	-1.48162		df	11	
P(T<=t) one-tail	0.084625		t Stat	0.0263	
t Critical one-tail	1.812461		P(T<=t) one-tail	0.489744	
P(T<=t) two-tail	0.16925		t Critical one-tail	1.795885	
t Critical two-tail	2.228139		P(T<=t) two-tail	0.979489	
			t Critical two-tail	2.200985	

VI. táblázat

A kontroll, az SI5/+, a Df(3R)229+kar^{3L}/+ és a Df(3R)T65/+ genotípusok összehasonlítása egyfaktoros variancia-analízissel

Anova: Single Factor						
Osszpeteszam						
SUMMARY						
Groups	Count	Sum	Average	Variance		
Kontrol	10	2025	202.5	7531.833		
SI5 +	7	1783	254.7143	7419.571		
229+KAR3L +	6	1713	285.5	7585.1		
T65 +	3	481	160.3333	170.3333		
ANOVA						
Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	44861.29	3	14953.76	2.184915	0.118504	3.049125006
Within Groups	150570.1	22	6844.095			
Total	195431.4	25				

Anova: Single Factor						
Atlagos fertilitas						
SUMMARY						
Groups	Count	Sum	Average	Variance		
Kontrol	10	759.99	75.999	1169.429		
SI5 +	7	651.23	93.03286	93.08486		
229+KAR3L +	6	524.49	87.415	292.2717		
T65 +	3	229.62	76.54	108.0196		
ANOVA						
Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	1434.829	3	478.2764	0.824565	0.494369	3.049125006
Within Groups	12760.77	22	580.035			
Total	14195.6	25				

VII. táblázat

A kontroll és az SI5/Df(3R)T65 genotípus összehasonlítása

F-Test Two-Sample for Variances		
Atlagos fertilitas		
	<i>Kontrol</i>	<i>SI5 T65</i>
Mean	75.999	21.42785714
Variance	1169.429188	1343.100126
Observations	10	14
df	9	13
F	0.870693975	
P(F<=f) one-tail	0.427776252	
F Critical one-tail	0.328132509	
t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances		
Atlagos fertilitas		
	<i>Kontrol</i>	<i>SI5 T65</i>
Mean	75.999	21.42785714
Variance	1169.429188	1343.100126
Observations	10	14
Pooled Variance	1272.052924	
Hypothesized Mean Difference	0	
df	22	
t Stat	3.695462978	
P(T<=t) one-tail	0.000631935	
t Critical one-tail	1.717144335	
P(T<=t) two-tail	0.001263871	
t Critical two-tail	2.073873058	

VIII. táblázat

A kontrol és a Df(3R)229+kar^{3L}/Df(3R)T65 genotípus összehasonlítása

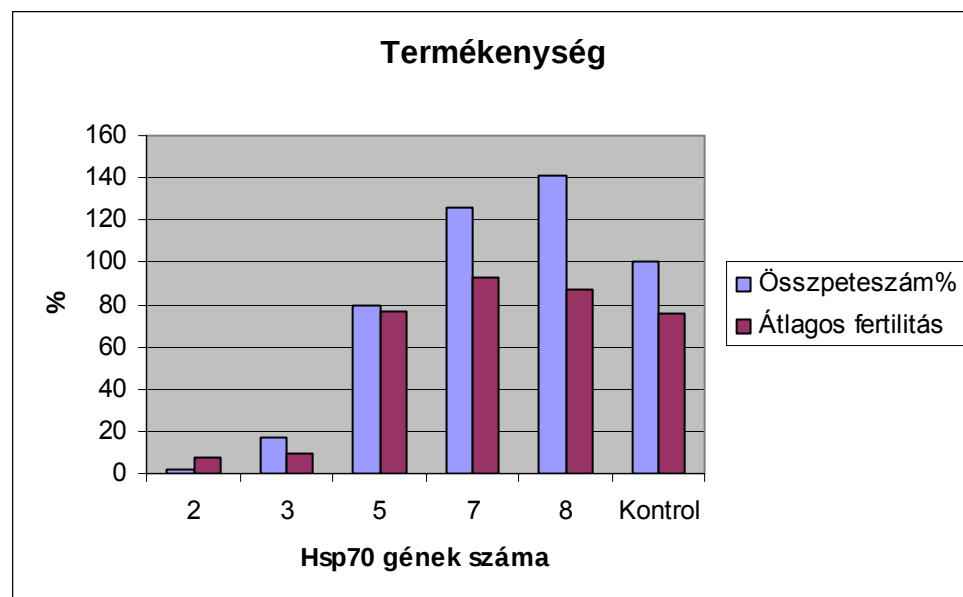
F-Test Two-Sample for Variances Osszpeteszam			F-Test Two-Sample for Variances Atlagos fertilitas		
	<i>Kontrol</i>	<i>229+KAR3L T65</i>		<i>Kontrol</i>	<i>229+KAR3L T65</i>
Mean	202.5	35	Mean	75.999	9.6
Variance	7531.833333	1152	Variance	1169.429188	15.792
Observations	10	2	Observations	10	
df	9	1	df	9	
F	6.538049769		F	74.05106241	
P(F<=f) one-tail	0.295171532	0.590343064	P(F<=f) one-tail	0.089960248	0.17992049
F Critical one-tail	240.5432547		F Critical one-tail	240.5432547	
t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances Osszpeteszam			t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances Atlagos fertilitas		
	<i>Kontrol</i>	<i>229+KAR3L T65</i>		<i>Kontrol</i>	<i>229+KAR3L T65</i>
Mean	202.5	35	Mean	75.999	9.6
Variance	7531.833333	1152	Variance	1169.429188	15.792
Observations	10	2	Observations	10	
Pooled Variance	6893.85		Pooled Variance	1054.065489	
Hypothesized Mean Difference	0		Hypothesized Mean Difference	0	
df	10		df	10	
t Stat	2.604403506		t Stat	2.636714187	
P(T<=t) one-tail	0.01314604		P(T<=t) one-tail	0.012436928	
t Critical one-tail	1.812461102		t Critical one-tail	1.812461102	
P(T<=t) two-tail	0.026292081		P(T<=t) two-tail	0.024873857	
t Critical two-tail	2.228138842		t Critical two-tail	2.228138842	

IX. táblázat

Az SI5/Df(3R)T65 és a Df(3R)229+kar^{3L}/Df(3R)T65 genotípus összehasonlítása

F-Test Two-Sample for Variances Osszpeteszam			F-Test Two-Sample for Variances Atlagos fertilitas		
	SI5 T65	229+KAR3L T65		SI5 T65	229+KAR3L T65
Mean	3.714285714	35	Mean	21.42785714	9.6
Variance	14.06593407	1152	Variance	1343.100126	15.792
Observations	14	2	Observations	14	
df	13	1	df	13	
F	0.012210012		F	85.04832296	
P(F<=f) one-tail	5.65616E-07	1.13123E-06	P(F<=f) one-tail	0.084693099	0.16938619
F Critical one-tail	0.214261562		F Critical one-tail	244.6898473	
t-Test: Two-Sample Assuming Unequal Variances Osszpeteszam			t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances Atlagos fertilitas		
	SI5 T65	229+KAR3L T65		SI5 T65	229+KAR3L T65
Mean	3.714285714	35	Mean	21.42785714	9.6
Variance	14.06593407	1152	Variance	1343.100126	15.792
Observations	14	2	Observations	14	
Hypothesized Mean Difference	0		Pooled Variance	1248.292417	
df	1		Hypothesized Mean Difference	0	
t Stat	1.302436012		df	14	
P(T<=t) one-tail	0.208426484		t Stat	0.439490688	
t Critical one-tail	6.313751514		P(T<=t) one-tail	0.333506953	
P(T<=t) two-tail	0.416852967		t Critical one-tail	1.761310115	
t Critical two-tail	12.70620473		P(T<=t) two-tail	0.667013905	
			t Critical two-tail	2.144786681	

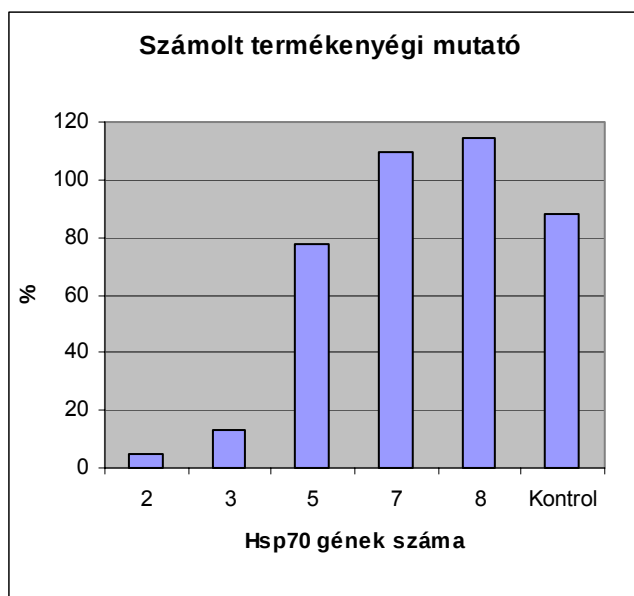
9. ábra



A hsp70 gének száma és a termékenység közötti összefüggés

Megfigyelhető, hogy a hsp70 gének számának csökkenésével csökken az összpateszám is. Az átlagos fertilitás tekintetében nem ilyen egyértelmű a csökkenés, viszont a transz-heterozigóták (2 és 3 hsp70 gén) és a heterozigóták (5-8 hsp70 gén) között ez is szignifikánsan különbözik.

10. ábra



A hsp70 gének száma és a termékenység változása a *számolt termékenységi mutatóval* kifejezve

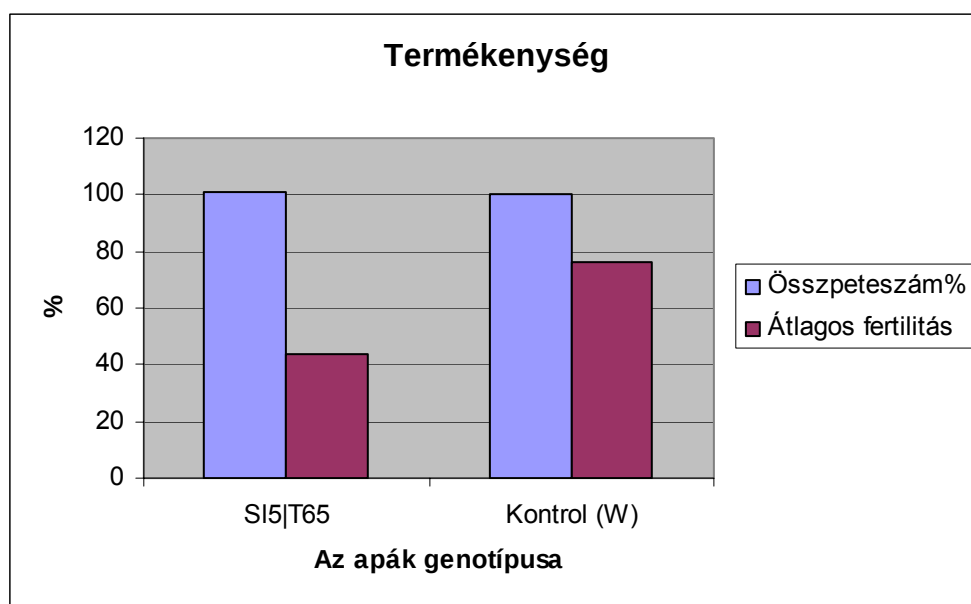
Jól látható, hogy a termékenység abszolút értelemben csökken a vizsgált hősokk-gének számának csökkenésével.

X. táblázat

A kontroll és a SI5/Df(3R)T65 hímek termékenysége az összehasonlítása

F-Test Two-Sample for Variances Osszpeteszam			F-Test Two-Sample for Variances Atlagos fertilitas		
	<i>Kontrol</i>	<i>SI5 T65 him</i>		<i>Kontrol</i>	<i>SI5 T65 him</i>
Mean	202.5	204.3333333	Mean	75.999	43.86666667
Variance	7531.8333	3746.333333	Variance	1169.4292	1353.870233
Observations	10	3	Observations	10	3
df	9	2	df	9	2
F	2.0104547		F	0.8637676	
P(F<=f) one-tail	0.3761103		P(F<=f) one-tail	0.3569194	
F Critical one-tail	19.384826		F Critical one-tail	0.2349351	
t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances Osszpeteszam			t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances Atlagos fertilitas		
	<i>Kontrol</i>	<i>SI5 T65 him</i>		<i>Kontrol</i>	<i>SI5 T65 him</i>
Mean	202.5	204.3333333	Mean	75.999	43.86666667
Variance	7531.8333	3746.333333	Variance	1169.4292	1353.870233
Observations	10	3	Observations	10	3
Pooled Variance	6843.5606		Pooled Variance	1202.9639	
Hypothesized Mean Difference	0		Hypothesized Mean Difference	0	
df	11	-	df	11	
t Stat	0.0336658		t Stat	1.4073591	
P(T<=t) one-tail	0.4868734		P(T<=t) one-tail	0.0934724	
t Critical one-tail	1.7958848		t Critical one-tail	1.7958848	
P(T<=t) two-tail	0.9737468		P(T<=t) two-tail	0.1869447	
t Critical two-tail	2.2009852		t Critical two-tail	2.2009852	

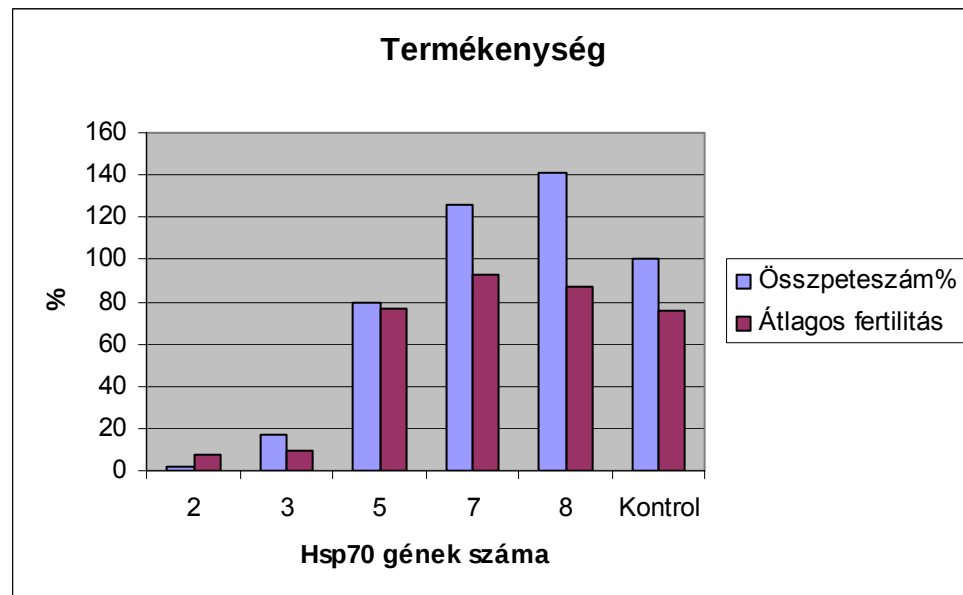
11. ábra



A hímek termékenység-tesztjének eredményét mutató grafikon

Látható, hogy amíg a nőstények által lerakott peték száma szinte teljesen megegyezik, addig a peték kikelési aránya (az átlagos fertilitás) nagy különbséget mutat.

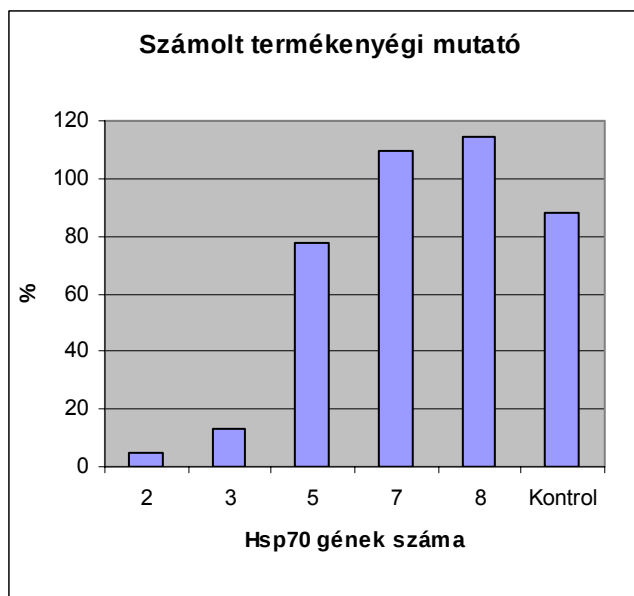
9. ábra



A hsp70 gének száma és a termékenység közötti összefüggés

Megfigyelhető, hogy a hsp70 gének számának csökkenésével csökken az összpateszám is. Az átlagos fertilitás tekintetében nem ilyen egyértelmű a csökkenés, viszont a transz-heterozigóták (2 és 3 hsp70 gén) és a heterozigóták (5-8 hsp70 gén) között ez is szignifikánsan különbözik.

10. ábra



A hsp70 gének száma és a termékenység változása a *számolt termékenységi mutatóval* kifejezve

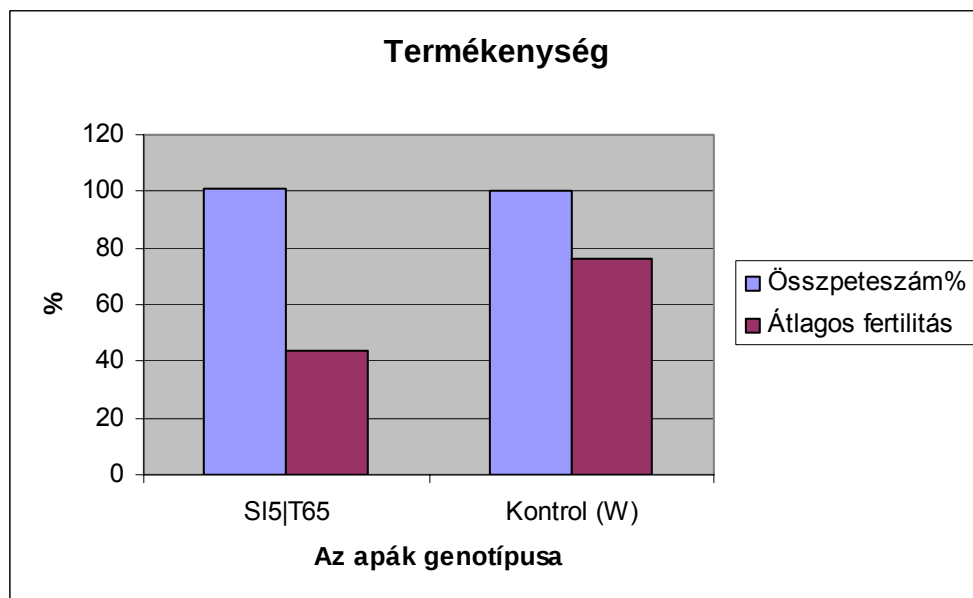
Jól látható, hogy a termékenység abszolút értelemben csökken a vizsgált hősokk-gének számának csökkenésével.

X. táblázat

A kontroll és a SI5/Df(3R)T65 hímek termékenységének az összehasonlítása

F-Test Two-Sample for Variances Osszpeteszam			F-Test Two-Sample for Variances Atlagos fertilitas		
	<i>Kontrol</i>	<i>SI5 T65 him</i>		<i>Kontrol</i>	<i>SI5 T65 him</i>
Mean	202.5	204.3333333	Mean	75.999	43.86666667
Variance	7531.8333	3746.333333	Variance	1169.4292	1353.870233
Observations	10	3	Observations	10	3
df	9	2	df	9	2
F	2.0104547		F	0.8637676	
P(F<=f) one-tail	0.3761103		P(F<=f) one-tail	0.3569194	
F Critical one-tail	19.384826		F Critical one-tail	0.2349351	
t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances Osszpeteszam			t-Test: Two-Sample Assuming Equal Variances Atlagos fertilitas		
	<i>Kontrol</i>	<i>SI5 T65 him</i>		<i>Kontrol</i>	<i>SI5 T65 him</i>
Mean	202.5	204.3333333	Mean	75.999	43.86666667
Variance	7531.8333	3746.333333	Variance	1169.4292	1353.870233
Observations	10	3	Observations	10	3
Pooled Variance	6843.5606		Pooled Variance	1202.9639	
Hypothesized Mean Difference	0		Hypothesized Mean Difference	0	
df	11		df	11	
t Stat	0.0336658		t Stat	1.4073591	
P(T<=t) one-tail	0.4868734		P(T<=t) one-tail	0.0934724	
t Critical one-tail	1.7958848		t Critical one-tail	1.7958848	
P(T<=t) two-tail	0.9737468		P(T<=t) two-tail	0.1869447	
t Critical two-tail	2.2009852		t Critical two-tail	2.2009852	

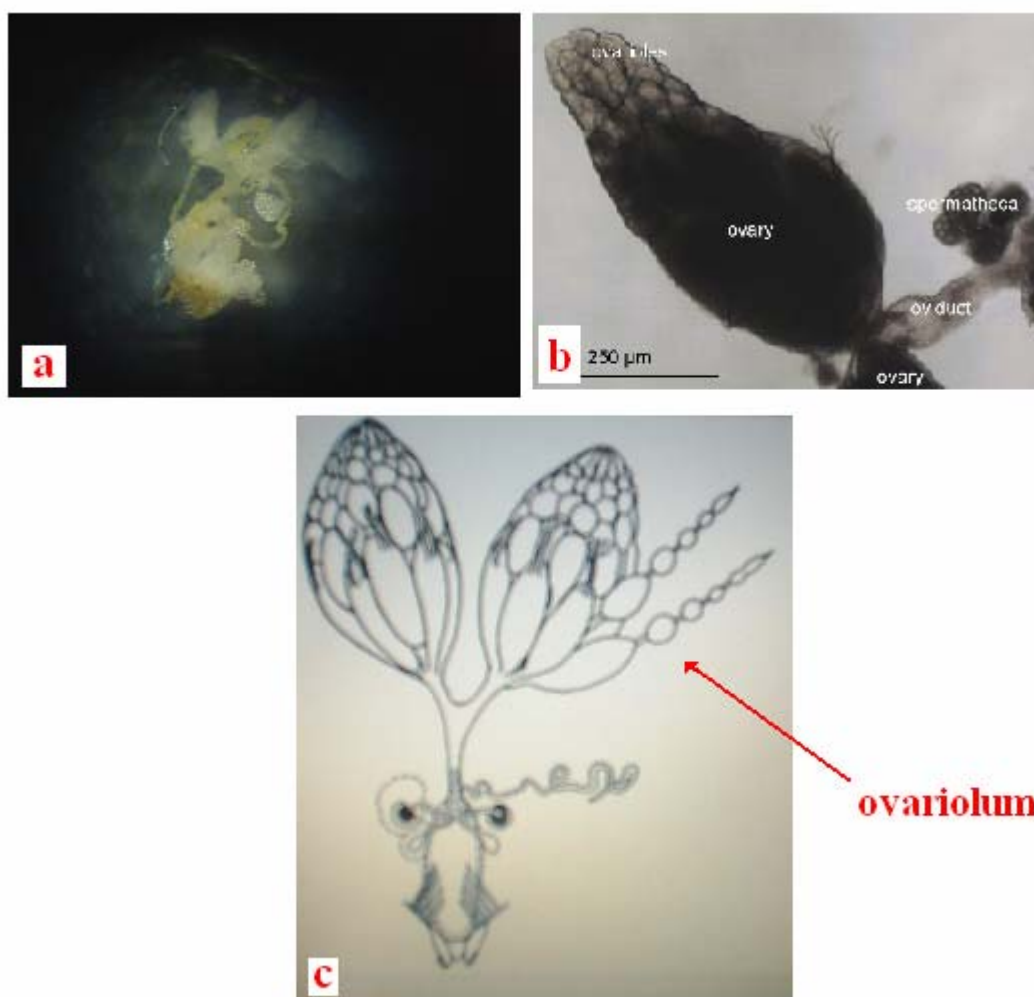
11. ábra



A hímek termékenység-tesztjének eredményét mutató grafikon

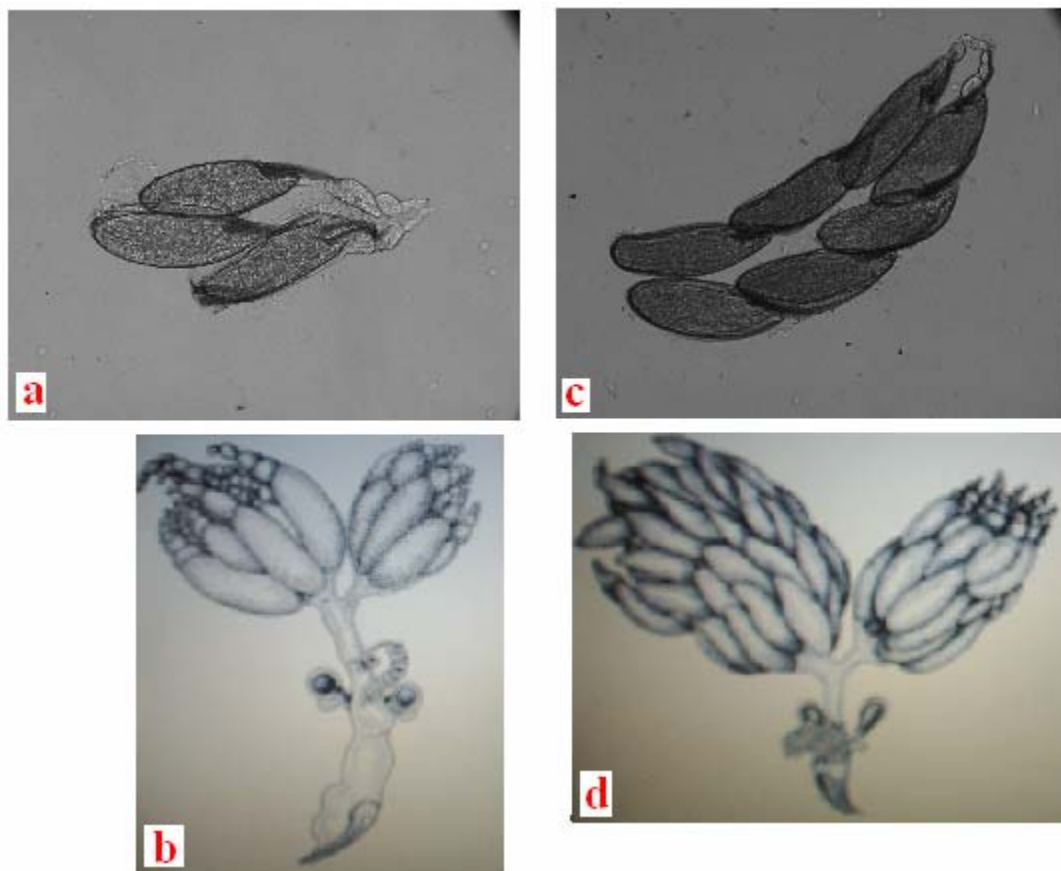
Látható, hogy amíg a nőstények által lerakott peték száma szinte teljesen megegyezik, addig a peték kikelési aránya (az átlagos fertilitás) nagy különbséget mutat.

12. ábra



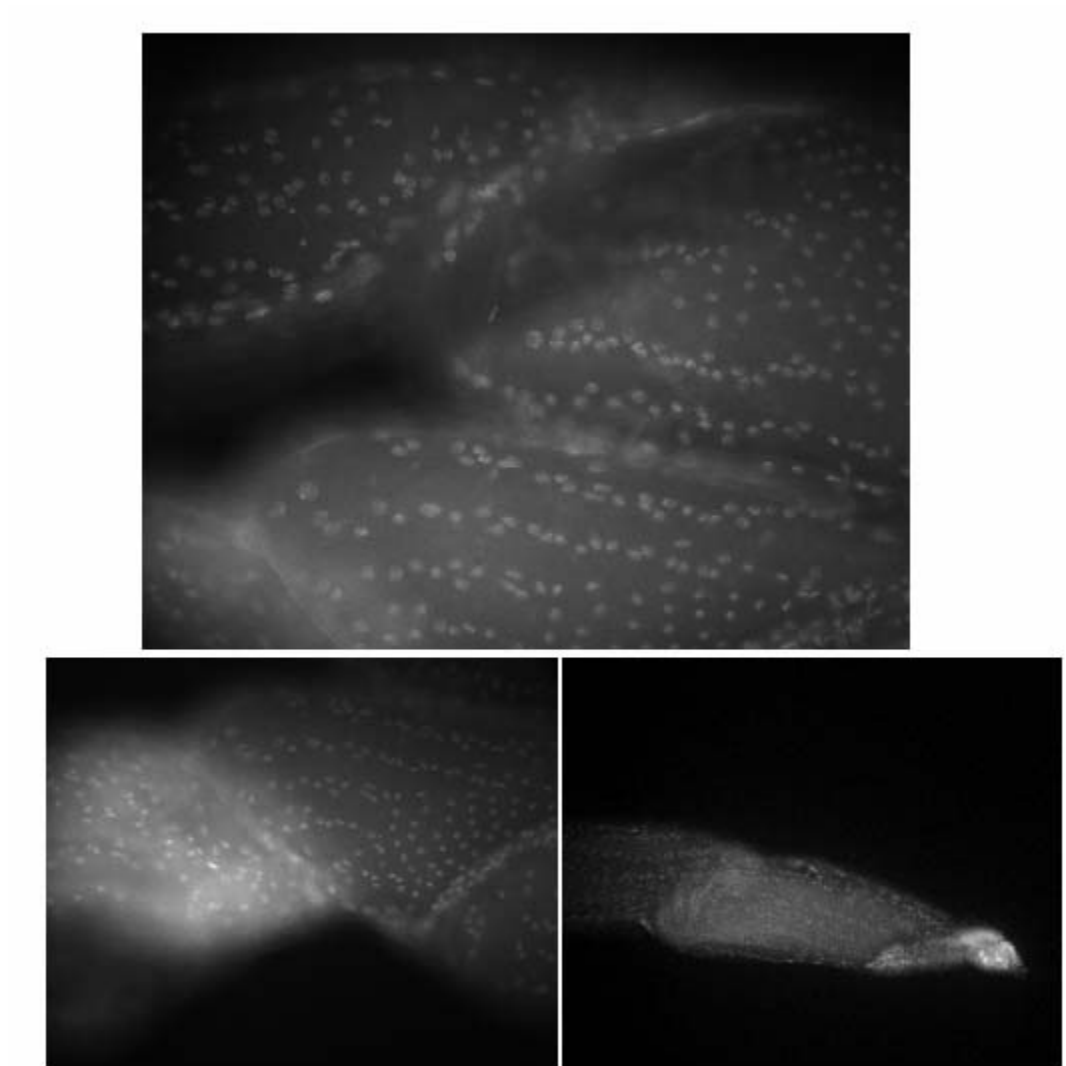
A *Drosophila melanogaster* ecetmuslica nőstényeinek petefészke. a és b : mikroszkópos felvételek az egész női szaporítókészülekről. c: grafika a női szaporítókészülekről, feltüntetve a petefészket alkotó gyöngysorszerű ovariolumokat (az „a” kép a szerzők saját felvétele, a „b” a FlyBase adatbázisból származik)

13. ábra



A normál (kontrol), illetve az *Sl5/Df(3R)T65* mutáns nőstény petefészke. a és b: a kontrol petefészkek darabkája (100X nagyítás), illetve egy grafika az egész petefészkekről. c és d: a mutáns petefészkekdarabkája (100X nagyítás) a felhalmozódott petékkel és egy grafika az egész petefészkekről (az „a” és „c” képek a szerzők felvételei, „b” és „d” a FlyBase adatbázis alapján).

14. ábra



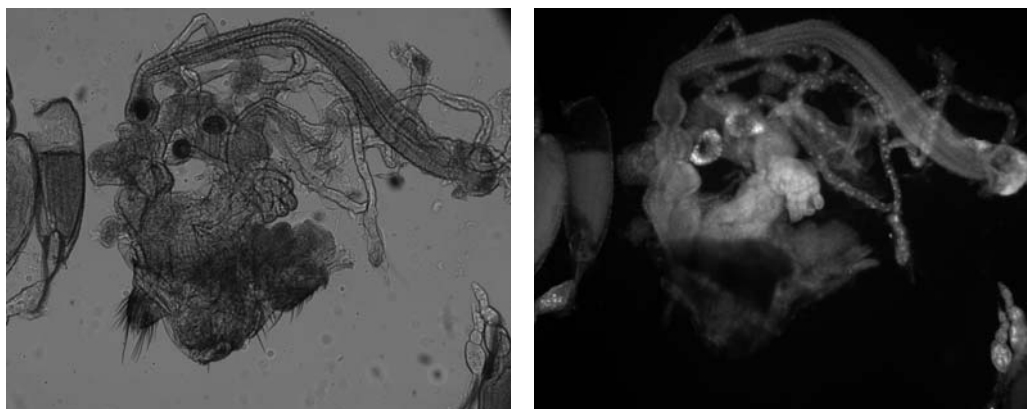
A follikuláris sejtréteg az egymáshoz tapadt peték felültén fluoreszcens mikroszkópban (400X, 200X illetve 100X nagyítás). A kis világító pontok a follikuláris sejtek magvai (a szerzők felvételei).

15. ábra



A felhalmozódott petéktől megduzzadt potrohú mutáns nőtény (a szerzők felvétele).

16. ábra



Egy *Sl5/Df(3R)T65* mutáns nőstény portrohszerveinek transzmissziós és fluoreszcens képe (50X nagyítás). Nem figyelhető meg semmilyen torzió (a béltraktus, a Maphigi-féle szerv és a nemi készülék nincs spirálisan megcsavarodva), ami a peterekást akadályozhatja (a szerzők felvételei).