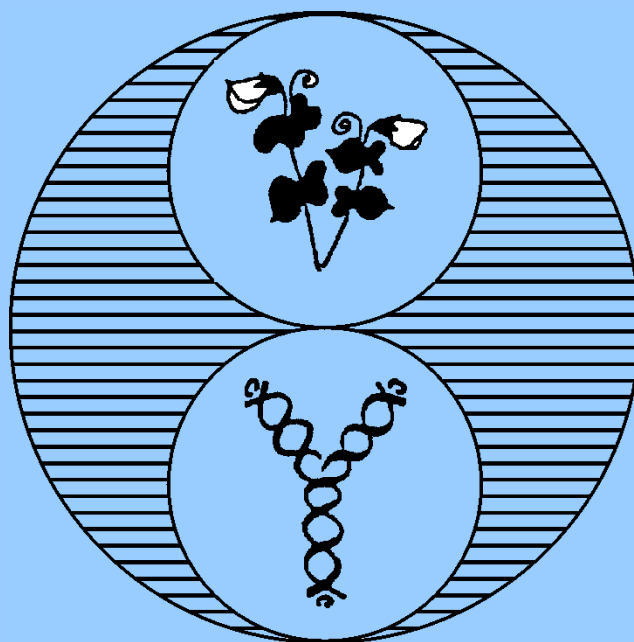


**GENETICKÁ SPOLEČNOST GREGORA MENDELA**

# **INFORMAČNÍ LISTY**



**Číslo 22**

**Srpen 2000**

## OBSAH

Zápis ze schůze výboru GSGM 1	
Vyúčtování hospodaření GSGM za rok 1999 .....	2
Uspořádané a připravované akce.....	4
Mendel Centenary Congress 2000.....	4
Študentská vědecká konference 2000.....	5
20. mezinárodní konference o genetice a molekulární biologii kvasinek.....	6
Katedra genetiky a mikrobiologie, PřF UK v Praze .....	7
Projednáání upraveného návrhu stanov GSGM.....	11
Co nového v genetice.....	17
R. Farkaš: Terminálne diferencované tkanivo <i>Drosophila melanogaster</i> : model pre mechanizmus regulácie génovej expresie pri diferenciácii eukaryotických buniek	

\*\*\*

---

Informační listy

**číslo 22, srpen 2000**

Vydává Genetická společnost Gregora Mendela

Redakční rada - Výbor GSGM

Výkonný redaktor - Doc. RNDr. Jiří Doškař, CSc.

Katedra genetiky a molekulární biologie

Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity v Brně

Kotlářská 2, 611 37 Brno

**ISSN 1210-6267**

# Zápis ze schůze výboru GSGM konané dne 24. května 2000 v Brně

Přítomni: prof. Zadražil, doc. Doškař, doc. Vlček, doc. Miadoková, doc. Ondřej, prof. Rosypal,  
prof. Dvořák, prof. Relichová, doc. Pikálek (jako host).

Omluven: doc. Bezděk

## 1. Zhodnocení dosavadní činnosti:

Bylo konstatováno, že činnost není výrazná, postrádáme vyšší aktivitu členů a genetických pracovišť, nicméně společnost se spolupodílela na pořádání některých vědeckých akcí:

- Byla podána zpráva o MCC 2000, kterou pořádala MZLU spolu s německou Gesellschaft für Pflanzenzüchtung. Zpráva a pozdravný úvodní projev z GSGM bude uveřejněn v IL (Relichová).
- Přislíbená účast GSGM jako spoluorganizátora symposia „Mendel 2000“, o kterou požádal na minulém zasedání výboru prof. Paleček se neuskutečnila, neboť organizace se ujala samotná AV ČR
- GSGM se spolupodílela na organizaci mezinárodní studentské vědecké konference 11. a 12. 4. 2000 (Dvořák).

Byla zřízena Web stránka (<http://orion.sci.muni.cz/gsgm>) a bude naplněna tímto obsahem:

- inovované stanovy
- seznam členů výboru vč. adresy pracoviště a kontaktu
- formulář přihlášky – evidenčního listu
- seznam členů GSGM a jejich pracovišť
- informace o členství ve FECS
- informace o připravovaných akcích

## 2. Příprava IL č. 22 – viz toto číslo

## 3. Plán akcí na příští období:

- na Slovensku budeme spoluorganizátory Symposia o DNA reparaci (Vlček, Miadoková)
- třetí týden v září 2001 uspořádáme v Brně genetickou konferenci, o programu budeme jednat na příští schůzi výboru v tomto roce
- připojíme se jako spolupřátelé mezinárodní konference o kvasinkách

## 4. Stav hospodaření:

- hospodář podal zprávu - na českém účtu je v současné době asi 20.000 Kč. Přesné vyúčtování českého i slovenského účtu bude uveřejněno v IL. Byla konstatována špatná morálka placení členských příspěvků. Pro následující období bude každému členu přiděleno evidenční číslo, to bude vypsáno ve složenke, aby byla možná kontrola placení čl. příspěvků. Členové budou vyzváni, aby spolu s příspěvkem na r. 2000 uhradili i případnou dlužnou částku. Hospodář nechá natisknout nové složenky.

## 5. Různé:

Předseda podal návrh na kooptaci doc. RNDr. Petra Pikálka, CSc. do výboru. Doc. Pikálek se podle počtu získaných hlasů umístil při posledních volbách do výboru GSGM na druhém místě, avšak pro tehdejší pracovní zaneprázdnění nemohl přijmout funkci ve výboru. Vzhledem k této skutečnosti byl doc. Pikálek jednomyslně schválen a kooptován jako další místopředseda společnosti. Doc. Pikálek s návrhem souhlasí.

Zapsala: J. Relichová

## Vyúčtování hospodaření GSGM za rok 1999

(na základě rozhodnutí výboru a v souladu s odpovídajícími předpisy je vedeno samostatné územní hospodaření)

### Česká část

**Zůstatek k 31. 12. 1998** **20 594,74 Kč**

z toho:

na účtu KB

17 949,24 Kč

v hotovosti

2 645,50 Kč

---

Příjmy v roce 1999

úroky z účtu

90,16 Kč

členské příspěvky

2 798,60 Kč

příspěvek firmy Boehringer

1 000,- Kč

**celkem**

**3 888,76 Kč**

---

Výdaje v roce 1999

poplatky za vedení účtu a položky

894,- Kč

úhrada škod za odcizené věci při

konferenci GSGM v Bratislavě v roce 1998

2 250,- Kč

schůze výboru GSGM (občerstvení)

310,80 Kč

poštovné za rozeslání IL č. 21

953,- Kč

**celkem**

**4 407,80 Kč**

---

**Zůstatek k 31. 12. 1999**

**20 075,70 Kč**

z toho:

na účtu KB

19 944,- Kč

v hotovosti

131,70 Kč

*Vyúčtoval: J. Dvořák*

## Slovenská časť

<b>Zostatok k 31.12.1998</b>	<b>11 854,01 Sk</b>
z toho:	
A - konto	9 179,91 Sk
B - hotovosť	2 674,10 Sk

### A

Zrušenie účtu vo VUB 28. 4. 1999 (dok.1)	
Zostatok na účte (dok.1)	+ 9 094,70 Sk
Bankové operácie	- 85,21 Sk
Založenie nového účtu v Tatra Banke 28. 10. 2000 (dok.2)	
Vklad na účet (dok.2)	+ 8 000,00 Sk
Prevedenie na hotovosť z účtu VUB	- 1 094,70 Sk
Príjmy z poplatkov k 31.12. 1999 (dok.3)	+ 1 546,59 Sk

---

**Zostatok na účte k 31.12.1999 (dok.3)** + **9 546,59 Sk**

### B

Vybraté z účtu vo VUB	+ 1 094,70 Sk
Členské príspevky	+ 1 300,00 Sk
Príspevok na Študentskú vedeckú konferenciu (dok.4)	- 676,40 Sk
Zakladač, obálky, xerox papier... (dok.5)	- 386,60 Sk
Pečiatky spoločnosti (dok.6)	- 616,00 Sk

---

Zostatok hotovosti k 31.12.1999 + 3 389,80 Sk

**Zostatok k 31. 12. 1999** + **12 936,39 Sk**

*Vyúčtovali: M. Slaninová, E. Miadoková*

# Uspořádané a plánované akce

## Mendel Centenary Congress 2000

Ve dnech 7. až 10. března 2000 uspořádala Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně spolu s Gesellschaft für Pflanzenzüchtung (Německo), pod patronací Akademie věd České republiky a Genetické společnosti G. Mendela *Mendel Centenary Congress, (MCC2000)*. Kongres se konal v rotundě pavilonu A na brněnském výstavišti a zúčastnilo se ho 394 účastníků z 20 zemí.

Při zahájení kongresu vystoupili s pozdravnými projevy náměstek ministra zemědělství Ing. Rybníček, primátor města Brna Dr. Duchoň, Prof. Nagata (Japan Mendel Society), Prof. Relichová (Genetická společnost G. Mendela) a rektor MZLU Prof. Procházka.

Podtitul kongresu zněl: *100 years of genetics for plant breeding – Mendel, meiosis and markers*. V tomto duchu byly uspořádány jednotlivé vyžádané přednášky do bloků, kde vystoupili přednášející ze zemí:

1. *Mendelian genes – Principles and application in breeding*: Swiecicki PL, Panayotov BG, Špunar CZ, Goncharenko RUS, Wilde D, Jansen D, Weber D, Melchinger D.
2. *Meiosis – Mechanism and genetic control*: Chadov RUS, Schweizer A, Lübberstedt D, Schwarzer UK, Schubert D, Schmidt D.
3. *Plant reproduction – Application in breeding*: Schwarz-Sommer D, Coupland UK, Mariani NL, Dresselhaus D, Glimelius S.
4. *The plant genome – Molecular structure and function*: Schmidt D, Matoušek CZ, Doležel CZ, Gierl D, Sasaki JAP, Gale UK.
5. *Non-Mendelian phenomena – Impact of apparent and real exceptions to the laws of 1865*: Herrman D, Vyskot CZ, Tsunewaki JAP, Becker D.
6. *Concluding lectures*: Salamini D, Frauen D.

Součástí kongresu byla prezentace 217 plakátových sdělení.

V bohatém společenském programu se uskutečnil seznamovací večírek, prohlídka města, přijetí přednášejících primátorem města Brna, setkání našich šlechtitelů s německými, návštěva Mendeliana, koncert v bazilice na Mendelově náměstí, exkurze do Lednice (Zahradnická fakulta MZLU, Mendeleum, Lednicko-Valtický areál) a do Moravského krasu a závěrečný večírek „U královny Elišky“. O přestávce koncertu přednesl P. Klemens Richter, praprasynovec G. Mendela a rovněž augustinián (ze Stuttgartu) přednášku „Vzpomínky na Gregora Mendela“.

Přednášky i abstrakta plakátových sdělení byly publikovány ve *Vorträge für Pflanzenzüchtung*, sv. 47 a 48, 2000.

Účastníci se shodovali v tom, že kongres měl vysokou úroveň, převážná většina přednášejících prezentovala své přednášky způsobem, který posluchačům přinesl mnoho nových pohledů na problematiku genetiky a šlechtění, ať již se jednalo o historický pohled či nejnovější výzkumy v určitých oblastech. Všichni shodně oceňovali perfektní organizaci a přátelskou atmosféru po celou dobu konání. Celý kolektiv organizátorů vedli Prof. O. Chloupek MZLU Brno a Prof. G. Röbbelen Gesellschaft für Pflanzenzüchtung Göttingen.

### **Text pozdravného projevu:**

Allow me to greet you all on behalf of the Gregor Mendel Society of Genetics with its seat in Brno. Tomorrow it will have been exactly 135 years since Mendel announced his concept of the origin and the development of the hybrid. His audience were the members of the Natural Science Society in Brno, mostly professors of the Technical Institute and the Modern Technical School and Brno intellectuals. These people were highly motivated by the achievements of the Humboldtian science. They developed the dynamic

concept of Nature by making inventories of plants and animals in Moravia and Silesia within their evolutionary studies. In this creative milieu Mendel presented his research into hybridization that he regarded as „the one correct way of finally reaching the solution to a question whose significance for the developmental history of organic forms could not be underestimated“. In spite of the fact that Mendel met no immediate significant support for his pea results, he went on studying the problem of hereditary units transmission in other plants than peas and even in the bee. His interdisciplinary approach of a physicist elaborating a mechanism of transfer of genetical units was incompatible with the then body of scientific knowledge. Mendel's theoretical model, the first in biology, became acceptable for the mainstream of science until in 1900.

After 1948 Mendelian genetics was rejected as the result of so-called bourgeois and reactionary Western science by the pro-Soviet regime. The years of expurgation of Mendelian genetics were coming to an end after 1958. The Czechoslovak Academy of Sciences organized an international Mendel Centenary Symposium in 1965 preceded by fierce debates of geneticists and Lysenkoists. 1965 marked a definite rehabilitation of Mendel's work in Czechoslovakia. In this connection it is worth mentioning the symposium on Induction of Mutations and the Mutation Process of 1963 that entered history of genetics marked by the names of Fahmy, Landa, Ondřej, Gichner, Velemínský, Hagemann and Röbbelen.

We wish you every success in your scientific discussions on genetics that started in Brno by Mendel's discovery in 1865.

*Děkujeme Dr. A. Matalové z Mendeliana za poskytnutí podkladů.*

\*\*\*

## **Študentská vedecká konferencia 2000**

V dňoch 11.-12.4.2000 sa na Prírodovedeckej fakulte Univerzity Komenského v Bratislave konala študentská vedecká konferencia. Na jej sponzorovaní sa podieľala aj Genetická spoločnosť G. Mendela. Autorka tohto príspevku zastupovala GSGM aj ako členka organizačného výboru konferencie. ŠVK 2000 bola výnimočná v tom, že sa po prvý krát otvorila aj pre diplomantov a doktorandov zo slovenských a českých vysokých škôl, ako aj pracovísk SAV a AVČR. Na konferenciu sa prihlásilo takmer 250 účastníkov z PRIF UK v Bratislave, SAV v Bratislave, SAV vo Zvolene, CHTF STU v Bratislave, PRIF UPJŠ v Košiciach, FPV UKF v Nitre, FPV UMB v Banskej Bystrici, AF SPU v Nitre, PŘIF UK v Prahe, PŘIF UP v Olomouci, CHTF Univerzity v Pardubiciach, PŘIF MU v Brne a z Národného múzea v Prahe. Konferencia bola rozdelená na dve časti. Prvá časť prebiehala v piatich sekciách vo forme súťaže. Zúčastnili sa na nej poslucháči 1. -4. ročníkov. V druhej časti poslucháči 5. ročníkov a doktorandi prezentovali výsledky svojej doterajšej vedeckej práce formou prednášok alebo posterov. Z tejto časti konferencie bol aj pod záštitou GSGM vydaný zborník 175 abstraktov referátov a posterových prezentácií. Toto podujatie bolo úspešné a organizátori očakávajú rovnako bohatú účasť študentov a doktorandov zo Slovenska i Českej republiky aj v roku 2001.

*E. Miadoková*

## 20. mezinárodní konference o genetice a molekulární biologii kvasinek (Praha, 26.-31. 8. 2001)

Mezinárodní konference o genetice a molekulární biologii kvasinek jsou pořádány pravidelně ve dvouletých intervalech v různých zemích Evropy. Přednášky předních světových odborníků v roce 2001 v Praze budou prezentovány v sedmi sympoziích a čtyřech minisympoziích, tematicky pokrývajících všechny hlavní současné směry genetického a molekulárně biologického kvasinkového výzkumu. V rámci konference se rovněž uskuteční 12 workshopů, umožňujících mladým vědeckým pracovníkům prezentovat dosud nepublikované výsledky jejich kvasinkového výzkumu v krátkých sděleních. Hlavní součástí konference bude 20 sekcí plakátových sdělení. Očekává se aktivní účast více než jednoho tisíce účastníků.

Moderní kvasinkový výzkum je ve svých prístupech kombinací metod klasické i molekulární genetiky, molekulární biologie v nejširším slova smyslu, biochemie a bioinformatiky. Kompletace poznatků o genomu kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, již bylo dosaženo široko u mezinárodní spolupráci zainteresovaných odborníků, a rovněž i očekávaná brzká kompletace poznatků o genomu další kvasinky, *Schizosaccharomyces pombe*, nabízejí dnes velice atraktivní a jedinečné experimentální systémy pro řešení zásadních biologických problémů. Mnoho nových poznatků z oblasti genetiky a molekulární biologie kvasinek je bezprostředně využitelných např. ve výzkumu nádorových onemocnění či v biotechnologiích.

Konference je pořádána v pražském Kongresovém Centru pod záštitou Federace Evropských a Mikrobiologických Společností (FEMS), Akademie Věd České Republiky, Univerzity Karlovy v Praze a její Přírodovědecké fakulty, přičemž hlavním pořadatelem je Mikrobiologický ústav AV ČR. Bližší informace o předběžném programu konference a o termínech a podmínkách přihlášek a registrace účastníků, o výši registračních poplatků i o možnostech ubytování je možno získat na internetové stránce

<http://www.biomed.cas.cz/yeast2001>, popř. na E-mailové adrese [yeast@biomed.cas.cz](mailto:yeast@biomed.cas.cz) (kontaktními osobami jsou Dr. Jiří Hašek a Dr. Eva Streiblová, Mikrobiologický ústav AV ČR, Vídeňská 270/1083, 142 20 Praha 4).

První oficiální oznámení budou rozesílána v průběhu července 2000, druhá (upřesněná) oznámení spolu s výzvou k zaslání abstraktů pak v průběhu listopadu 2000 (konečný termín pro zaslání abstraktů je duben 2001). Konečný termín pro potvrzení účasti je květen 2001. Výše konferenčního poplatku činí 430 \$ (při opožděné registraci 530 \$), pro studenty pod 30 let věku 250 \$ (resp. 300 \$). Pro umožnění účasti na konferenci pořadatelé nabízejí stipendia pro omezený počet vybraných mladých vědeckých pracovníků.

Z. Palková, P. Pikálek



**Katedra genetiky a mikrobiologie**  
**Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze,**

Viničná 5, 128 44 Praha 2

tel.: 02/21953407, fax: 02/21953316, E-mail: [molbio@natur.cuni.cz](mailto:molbio@natur.cuni.cz)

Vedoucí katedry: Doc. RNDr. Petr Pikálek, CSc., tel.: 02/21953162, E-mail: [pikalek@natur.cuni.cz](mailto:pikalek@natur.cuni.cz)

---

**(V rámci informací o českých a slovenských genetických pracovištích  
uvádějí IL další pokračování)**

*Úvod.*

**Katedra genetiky a mikrobiologie PŘF UK v Praze** (dále jen KGM) je dnes svým počtem pracovníků i spektrem diplomních specializací, které vědeckopedagogicky garantuje a zajišťuje, druhým největším pracovištěm ve svazku biologických kateder pražské přírodovědecké fakulty. Co do počtu studentů, za jejichž specializační výchovu přímo odpovídá, je však z nich jednoznačně katedrou největší. Velice potěšující je skutečnost, že se v posledních několika letech úspěšně daří katedru personálně „omladit“, a že na ní vedle zkušených vědeckopedagogických pracovníků dnes úspěšně působí i poměrně rozsáhlá řada jejich mladších kolegů.

*Historie.*

KGM, která v roce 1959 na pražské přírodovědecké fakultě původně vznikla sloučením příslušných oddělení Ústavu pro anatomii a fyziologii rostlin a Mikrobiologického ústavu (s tehdejšími názvy *katedra mikrobiologie a genetiky*), má historicky poněkud pohnutý vývoj. Samostatný Genetický ústav, založený v roce 1947 jedním ze zakladatelů československé poválečné genetiky prof. Karlem Hrubým, v období lysenkismu zanikl, a bylo mimořádnou zásluhou prof. Hrubého, že se tehdy genetika na pražské přírodovědecké fakultě mohla dál rozvíjet pod ochrannými křídly zmíněného Ústavu pro anatomii a fyziologii rostlin. Prvním vedoucím KGM byl mikrobiolog doc. Jiří Stárka. Dominujícími odbornými směry katedry byly tehdy problematika růstu a dělení bakterií, fyziologie bakterií, genetika bakteriofágů, mutační a biochemická genetika mikrobů, biochemická a kvantitativní genetika rostlin, cytogenetika rostlin, genetika hospodářských zvířat apod. V roce 1965, v přímé souvislosti s tehdejšími pražskými mezinárodními mendelovskými kongresy a následným usnesením vlády ČSSR o rozvoji genetiky, došlo k ustálení dnešního názvu katedry.

Již od počátku 60. let na KGM působila (pod vedením prof. Jaroslava Drobníka) pracovní skupina zaměřená na studium struktury a funkce nukleových kyselin, z níž v roce 1967 vzniklo samostatné biofyzikální oddělení. Katedra se tehdy přejmenovala na katedru genetiky, mikrobiologie a biofyziky. V letech 1970-78 KGM vedl genetik doc. Jan Nečásek, a v letech 1978-1989 pak mikrobioložka prof. Olga Bendová. V tomto období také na KGM vznikla (zejména díky aktivitám doc. Vladimíra Vondrejse, Ing. Vojtěcha Závady, prof. Olgy Bendové a prof. Stanislava Zadražila) poměrně velmi silná pracovní skupina molekulární biologie, zajišťující výuku a výzkum v oblasti molekulární biologie a genetiky mikroorganismů.

V roce 1987 přešlo – z politických důvodů – celé biofyzikální oddělení (tehdy již pod vedením prof. Františka Fremutha) pod tehdejší katedru ochrany životního prostředí, a KGM se vrátila zpět ke svému původnímu názvu, pod nímž působí dodnes. Zatímco odchod tehdejších biofyziků pro KGM neznamenal, při existenci úspěšné molekulárně biologické skupiny, prakticky žádnou ztrátu, za jednoznačný krok zpět lze pokládat rovněž politicky vynucený odchod skupiny genetiky živočichů Dr. Bohumíra Knížete (v roce 1970) pod katedru fyziologie živočichů, kde v průběhu dalších let zcela zanikla.

V bezprostředním polistopadovém období v letech 1989-90 vedl KGM krátce virolog Ing. Vojtěch Závada, jednomyslně tehdy zvolený do této funkce jak pracovníky, tak studenty katedry. Po něm se pak v řádném výběrovém řízení stal vedoucím katedry biochemik, molekulární biolog a molekulární genetik prof. Stanislav Zadražil, do té doby vedoucí vědecký pracovník ÚMG ČSAV a

externí učitel katedry. Ten vedl KGM až do roku 1998. Tehdy se na katedře zformovala také samostatná molekulárně virologická pracovní skupina (pod vedením doc. Jitky Forstové), s vynikajícím vědeckovýzkumným i laboratorním zázemím.

V současnosti zastává funkci vedoucího katedry genetik doc. Petr Pikálek.

### Výuka.

KGM zajišťuje v magisterském studiu základní i specializační výuku, a to v integrálním studijním oboru Biologie jak v odborném, tak v učitelském směru studia, a ve čtyřech diplomních specializacích odborného biologického studia: *Genetika*, *Molekulární biologie*, *Mikrobiologie*, a *Virologie*. V základní výuce společně pro všechny studenty oboru Biologie - v období právě probíhajícího přechodu od rigidních učebních plánů ke kreditnímu systému studia - KGM zajišťuje výuku sedmi striktně povinných či povinně volitelných základních předmětů, a pro navazující specializační výuku v diplomních zaměřeních nabízí několik desítek dalších povinných či volitelných předmětů výběrových.

Ve šk. roce 1999/2000 studovalo na KGM v jejich diplomních specializacích ve třetím, čtvrtém a pátém roce svého magisterského studia celkem na 70 diplomantů. O jejich vynikající úrovni svědčí skutečnost, že 16 z nich, kteří končili svoje studium v letošním jarním termínu státních magisterských zkoušek, obhájilo diplomovou práci s klasifikací „výborně“, a že prakticky všichni tito letošní absolventi prezentovali výsledky svojí práce osobním vystoupením na vědeckých konferencích, a mnozí z nich je dokonce již zveřejnili formou původních vědeckých článků v renomovaných vědeckých časopisech. Samozřejmostí je běžná praxe, že zadávaná témata diplomových prací jsou součástí řešení oficiálních výzkumných projektů (institucionálních i grantových), a že diplomanti jsou jejich aktivními spoluřešiteli. Běžnou se stává v posledních letech rovněž skutečnost, že nejúspěšnější diplomanti katedry jsou pravidelně - v kompetici s diplomanty ostatních kateder pražské PŘF UK - oceňováni nejrůznějšími cenami za vynikající studijní výsledky (Cena Josefa Hlávky, Cena rektora UK v přírodovědné kategorii, Cena Jaroslava Heyrovského apod.).

V doktorském studiu KGM garantuje a řídí výchovu doktorandů ve studijních oborech *Molekulární a buněčná biologie*, *genetika a virologie* (po téměř desetiletém působení prof. Zdražil jako předsedy oborové rady je současným předsedou doc. Petr Pikálek) a *Mikrobiologie* (současnou předsedkyní přísl. oborové rady je doc. Jaroslava Svobodová). Ve šk. roce 1999/2000 studovalo na KGM v doktorském studiu celkem 72 doktorandů v prvním uvedeném oboru (34 p rezenční a 48 kombinovanou formou), a 22 doktorandů ve druhém uvedeném oboru (12 p rezenční a 10 kombinovanou formou). K tomu je však třeba ještě připočítat dalších 60 doktorandů oboru *Molekulární a buněčná biologie*, *genetika a virologie* ze tří pražských lékařských fakult UK (41 v prezenční formě a 19 v kombinované formě studia), které zdejší oborová rada administrativně spravuje, protože má při UK jako jediná akreditaci v daných oborech doktorského studia.

Široký výukový záběr jak v pregraduálním, tak v postgraduálním stupni studia může KGM zvládnout jenom díky svojí dlouholeté koncepci rozsáhlé a velmi intenzivní spolupráce jednak s pracovišti AV ČR (především s Ústavem molekulární genetiky, Mikrobiologickým ústavem, Fyziologickým ústavem, Ústavem experimentální botaniky, Ústavem molekulární biologie rostlin, Ústavem živočišné fyziologie a genetiky, Ústavem experimentální medicíny apod.), jednak zejména s genetickými pracovišti sesterských pražských lékařských fakult UK. Mnohé specializační předměty z výukové nabídky katedry jsou pravidelně vyučovány externími učiteli z uvedených mimofakultních ústavů a pracovišť, a rovněž zhruba polovina diplomantů a asi dvě třetiny doktorandů KGM vypracovávají svou diplomovou nebo doktorskou disertační práci mimo vlastní laboratoře katedry.

### Výzkumná práce.

KGM je - především - koordinačním pracovištěm jednoho z osmi fakultních výzkumných záměrů (VZ MŠMT ČR 113100003: *Regulace a signalizace v živých systémech*, koordinátor prof. Stanislav Zdražil), jehož cílem je detailní poznání regulačních procesů, uplatňujících se při reprodukci, ontogenezi a evoluci živých organismů, se snahou charakterizovat signální dráhy, zprostředkující přenos informace (v nejširším slova smyslu) o vnitřním stavu daného živého systému a o interakcích tohoto systému s prostředím. Tento fakultní výzkumný záměr tematicky i metodicky

zahrnuje oblasti molekulární biologie, biochemie, imunologie, vývojové biologie, genetiky, mikrobiologie, virologie a fyziologie, a formou úzce propojené řízené vědecké spolupráce se na jeho řešení spolupodílejí i pracovní skupiny ze 4 dalších biologických kateder PřF UK.

Katedra je rovněž nositelem jednoho z významných a finančně „velkokapacitních“ grantových projektů MŠMT ČR v rámci celostátního programu „Posílení výzkumu na VŠ“ (*Antigeny tumorogenních virů: Vlastnosti, funkce a interakce se strukturami hostitelských buněk*, řešitelka doc. Jitka Forstová).

Naprostou samozřejmostí je běžná praxe, že individuální dílčí výzkumná činnost pracovníků KGM musí být finančně zabezpečena přidělením odpovídajícího grantu. Pracovníci katedry, kteří trvale nejsou úspěšní v grantových kompeticích, mají podstatně sníženou možnost finančního zajištění jak svého vlastního výzkumu, tak případného začlenění studentů KGM do jeho řešení, a to se všemi nepříznivými důsledky, které z toho pro ně do budoucna vyplývají.

KGM byla v roce 1999 nositelkou následujících výzkumných grantových projektů:

#### *A/ GAČR*

- 206/98/P250 Evoluce systémů pohlavních chromosomů u pavoukoců (řešitel Dr. Jiří Král)
- 204/98/0443 Úloha fosforylace proteinů v diferenciaci streptomycetů (řešitel Dr. Josef Náprstek)
- 204/97/P009 Cytoplasmatické viry a plasmidy kvasinek (řešitel Dr. Martin Pospíšek)
- 204/98/1195 Cytoplasmatické viry a plasmidy kvasinek jako modely pro studium buněčných funkcí a virů vyšších eukaryot (řešitel Dr. Martin Pospíšek)
- 204/97/0528 Molekulární mechanismy regulace exprese chromosomových a plasmidových genů koryneformních bakterií (řešitelka doc. Jaroslava Svobodová)
- 204/99/1196 Kvasinkové kolonie: Morfologie a signální systémy (řešitelka doc. Zdena Palková)
- 204/00/0271 Ultrastrukturní studia interakcí antigenů polyomaviru se substrukturami tímto virem infikovaných buněk (řešitelka doc. Jitka Forstová)
- 204/00/0629 Role membrány při interakci buňky s exogenními proteiny: Interakce kvasinkové plasmatické membrány se zymociny (řešitelka doc. Blanka Janderová)

#### *B/ FRVŠ (a ostatní programy MŠMT ČR)*

- 1495 H Inovace vybavení laboratoří pro základní a specializovaná mikrobiologická praktika (řešitelka doc. Jaroslava Svobodová)
- OK 372 Polyomavirové pseudokapsidy jako vektory: Aplikace VP1 pseudokapsid pro genetické a imunologické terapeutické účely (řešitelka doc. Jitka Forstová)

#### *C/ Interní GA UK*

- 293/1999-B-BIO Mutace v nerostoucích buňkách *Saccharomyces cerevisiae* (řešitelka Mgr. Zuzana Storchová)
- 111/1998-B-BIO Evoluce karyotypu u vybraných skupin pavouků (řešitel Dr. Jiří Král)
- 110/1998-B-BIO Fotosyntetické charakteristiky thylakoidních membrán inbrední a hybridní kukuřice a jejich role při genetické determinaci vysokého fotosyntetického potenciálu (řešitelka Mgr. Dana Holá)
- 103/1998-B-BIO Ultrastruktura chloroplastů a fotosyntetické charakteristiky listů kukuřice na různých místech listové čepele a v průběhu cirkadiálního cyklu (řešitelka Mgr. Dana Holá)
- 164/1997-B-BIO Účinek alkoholů na strukturu bakteriální cytoplasmatické membrány (řešitelka doc. Jaroslava Svobodová)
- 82/1998-B-BIO Charakterizace mutací zakládajících vznik papil na koloniích kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* (řešitel doc. Vladimír Vondřejš)
- 130/2000-B-BIO Izolace a charakterizace kmenů *Saccharomyces cerevisiae* se změněnou sensitivitou ke killer proteinům (řešitelka doc. Blanka Janderová)

- 254/1997-B-BIO Genetická analýza morfologie kvasinkových kolonií (řešitelka doc. Zdena Palková)

KGM je v současnosti rovněž řešitelským pracovištěm výzkumného projektu v rámci mezinárodního mimořádně prestižního grantového programu *Howard Hughes Medical Institute Award*, a to konkrétně „Structural Antigens of Papovaviruses: Functions, Cellular Interactions and Utilisation“ (HHMI No.75195540501, řešitelka doc. Jitka Forstová).

Zvláštní pozornosti zaslouží naprosto mimořádné ocenění výzkumné práce KGM v letošním roce, a to udělení ceny Učené Společnosti České Republiky doc. Zdeně Palkové za její objevy, týkající se podstaty a mechanismů extracelulární komunikace mezi kvasinkovými buněčnými koloniemi.

### **Současné vědeckovýzkumné zaměření, členění a personální obsazení**

KGM je v současnosti neformálně organizačně rozčleněna na čtyři větší pracovní skupiny (jejichž výzkumná problematika se často vzájemně překrývá), a to:

- 1/ *Molekulární biologie* (vedoucí prof. Stanislav Zadražil, a dále doc. Vladimír Vondřejš, RNDr. ....Martin Pospíšek, Mgr. Zuzana Storchová, Mgr. Tomáš Mašek, Mgr. Václav Vopálenský)
- 2/ *Genetika* (vedoucí doc. Petr Pikálek, a dále doc. Zdena Palková, RNDr. Marie Kočová, RNDr. Jiří Král, RNDr. Roman Krejčí, RNDr. Michaela Schierová, Ing. Jana Musilová, Mgr. Dana Holá, Mgr. Lucie Mináriková, Mgr. Anna Vičánková, Mgr. Tomáš Adamec, Mgr. Martin Kuthan,)
- 3/ *Mikrobiologie* (vedoucí doc. Jaroslava Svobodová, a dále doc. Blanka Janderová, RNDr. Ivo Konopásek, RNDr. Josef Náprstek, RNDr. Blanka Zikánová, Mgr. Hana Flegelová, Mgr. Irena Horová, Mgr. Ondřej Toman, Mgr. Jiří Mašín)
- 4/ *Virologie* (vedoucí doc. Jitka Forstová, a dále RNDr. Jiřina Hahnová, Mgr. Hana Španielová, Mgr. Dana Holländerová, Mgr. Petra Mannová, Mgr. Zuzana Richterová).

Výzkum je v rámci těchto neformálních pracovních skupin konkrétněji zaměřen zejména na studium cytoplasmatických genetických determinantů u hub (dílní pracovní podskupina Dr. Pospíška), na studium killer fenomenu u kvasinek (pracovní podskupina doc. Janderové), evoluce nových vlastností kvasinek za různých selekčních podmínek (pracovní podskupina doc. Vondřejse), extracelulární komunikace a signalizace u kvasinek (pracovní podskupina doc. Palkové), genetické variability ve fotosyntetických charakteristikách kulturních plodin (pracovní podskupina Dr. Kočové), genetické regulace metabolismu síry u *Aspergillus terreus* (pracovní podskupina Dr. Schierové), genetické mapy basidiomycetu *Phanerochaete chrysosporium* (pracovní podskupina doc. Pikálka), karyotypizace pavoukovic (pracovní podskupina Dr. Krále), úlohy cytoplasmatické membrány v adaptační odpovědi bakterií na šokové podmínky prostředí (pracovní podskupina doc. Svobodové), antigenů nádorových DNA-virů a jejich interakcí se strukturami hostitelských buněk (pracovní podskupina doc. Jitky Forstové), a konečně na studium struktury a funkce pozdních antigenů polyomaviru a využití získaných proteinů v genové terapii (rovněž pracovní podskupina doc. Forstové).

*P. Pikálek*

# Projednáání upraveného návrhu stanov GSGM

Vzhledem k zastaralému znění platných stanov GSGM, které bylo spojeno s osamostatněním sekce obecné genetiky ČsBS v době existence Československé republiky, připravil výbor nově upravený text stanov a předkládá ho na stránkách IL všem členům GSGM k obecné diskusi. Všechny připomínky a návrhy zasílejte, prosím, do konce října tr. jednatelce společnosti prof. RNDr. J. Relichové, Csc. (Katedra genetiky a molekulární biologie, PřF MU, Kotlářská 2, 611 37 Brno, ČR). Konečné znění bude schváleno spolu s vypsáním a realizací voleb nového výboru společnosti.

\*\*\*

## GENETICKÁ SPOLEČNOST GREGORA MENDELA (*STANOVY SPOLEČNOSTI*)

---

### I. Poslání a cíle společnosti

#### § 1

(1) GENETICKÁ SPOLEČNOST GREGORA MENDELA (dále jen GSGM) je dobrovolné sdružení pracovníků zabývajících se genetikou, a to jak profesionálně, tak soukromě z vlastního zájmu. Cílem GSGM je sdružovat genetické pracovníky a zájemce o genetiku, zprostředkovávat odbornou komunikaci mezi nimi navzájem i se zahraničními genetiky, zajišťovat jejich informovanost o nejnovějších směrech a poznatcích v oboru genetiky, vytvářet podmínky pro prezentaci jejich vědeckovýzkumné práce v oboru genetiky a podílet se na koncepční, poradenské, prognostické a jiné činnosti v tomto oboru.

(2) GSGM vznikla jako sdružení registrací ve smyslu zák.č. 83/1990 Sb.

(3) GSGM se vyčlenila z Československé biologické společnosti. Navazuje na program a činnost její Sekce pro obecnou genetiku (přejmenovanou v roce 1990 na GSGM), a je proto v tomto smyslu pokračování této sekce jako samostatná společnost.

#### § 2

(1) GSGM je právnickou osobou a vykonává činnost v souladu se svým posláním.

(2) GSGM působí na územích České Republiky a Slovenské Republiky. Sídlem GSGM je Brno (Česká Republika).

#### § 3

(1) Své poslání a cíle uvedené v § 1 odst. (1) GSGM naplňuje zejména tím, že

a/ organizuje a pořádá vědecké konference, semináře, pracovní setkání, přednášky, diskuze, školící kurzy, tematické zájezdy a jiné obdobné společenské akce, zaměřené na genetickou problematiku;

b/ zpracovává a předkládá příslušným odborným pracovníkům, státním orgánům a ostatním subjektům návrhy, podněty a doporučení k opatřením, týkajícím se oboru genetiky;

c/ vyjadřuje se k vědecké a publikační činnosti a dalším vědeckým a odborným aktivitám v oboru genetiky;

d/ podle možností vypisuje souhrnně a oceňuje významné výsledky pedagogické, vědeckovýzkumné a odborné činnosti v oboru genetiky;

e/ vydává písemný informační bulletin a popř. i další písemné materiály, zaměřené na problematiku genetiky a poskytující informace o tuzemských i zahraničních akcích souvisejících s problematikou genetiky;

f/ poskytuje svým členům odbornou pomoc.

(2) GSGM spolupracuje s Československou biologickou společností i s dalšími českými a slovenskými vědeckými společnostmi. V zahraničí spolupracuje především s genetickými společnostmi sdruženými ve FEGS (Federation of European Genetic Societies).

## Členství

### § 4

(1) Členství v GSGM je řádné nebo čestné.

(2) Členem GSGM může být fyzická osoba starší 18 let, jestliže písemně požádá o členství v GSGM a písemně prohlásí, že bude v GSGM působit ve smyslu jejich stanov. O přijetí za člena rozhoduje výbor GSGM.

(3) Fyzické osoby mladší 18 let mohou být čekateli na členství. Čekatelé mají právo využívat všech výhod GSGM, nemohou však volit a být voleni do samosprávných orgánů GSGM. Dověšením věku 18 let se čekatelé na členství automaticky stávají členy GSGM se všemi právy a povinnostmi řádných členů GSGM.

(4) Čestným členem GSGM se může stát významný domácí (tzn. český nebo slovenský) nebo zahraniční vědecký odborník, působilý v oboru genetiky, nebo i vědecký pracovník z jiného oboru, který se význačným způsobem zasloužil o rozvoj genetiky. Čestný člen je zproštěn povinnosti platit členské příspěvky. Čestní členové jsou voleni plénem GSGM po projednání a předložení příslušného návrhu na čestné členství výborem GSGM.

## Práva členů

### § 5

(1) Každý řádný i čestný člen má právo:

a/ zúčastňovat se všech akcí pořádaných GSGM a být informován o termínech jejich konání a o jejich programu;

b/ být informován o činnosti GSGM, tzn. dostávat zdarma a pravidelně informační bulletin GSGM a popř. i další písemné materiály připravované výborem GSGM pro informování členstva;

c/ volit a být volen do samosprávných orgánů GSGM;

d/ stát se členem odborných komisí, pracovních skupin a jiných odborných orgánů, pokud jsou v GSGM účelově ustaveny či jmenovány;

e/ vyjadřovat se k činnosti GSGM a k práci jejího výboru, a předkládat, prosazovat a obhajovat svoje vlastní návrhy, podněty, iniciativy a kritické připomínky;

f/ podávat návrhy na udělení čestného členství, p. opř. ocenění, čestného uznání či jiného vyznamenání GSGM, pokud je takové ocenění, uznání nebo vyznamenání udělováno;

g/ jednat a hlasovat o všech návrzích podávaných výborem GSGM plénu nebo valnému shromáždění k rozhodnutí.

## **Povinnosti členů**

### **§ 6**

(1) Řádný člen GSGM je povinen zejména:

a/ dodržovat stanovy GSGM a aktivně se podílet na její činnosti;

b/ plnit povinnosti vyplývající z jeho příp. funkcí v samosprávných či jiných orgánech GSGM;

c/ platit pravidelně ve stanovených termínech a ve stanovené výši členské příspěvky;

d/ za všech okolností dodržovat všeobecně uznávané normy a zásady etiky vědecké práce.

(2) Čestný člen GSGM má stejné povinnosti jako řádný člen, kromě povinnosti platit členské příspěvky.

(3) Členské příspěvky ve výši stanovené a schválené podle § 8 odst. (2) písm. e/ platí všichni řádní členové GSGM, kromě čekatelů na členství (§ 4 odst. (3)) a studentů. Čekatelé na členství a studenti platí pravidelně ve stanovených termínech členský příspěvek v poloviční výši.

## **Zánik členství**

### **§ 7**

(1) Řádné nebo čestné členství v GSGM zaniká:

a/ písemným prohlášením člena, že z GSGM vystupuje;

b/ úmrtím člena;

c/ vyloučením člena.

(2) Řádný nebo čestný člen může být z GSGM vyloučen pouze ze závažných důvodů, a to zejména tehdy, jestliže se prokazatelně provinil proti platným zákonům České Republiky (u českých členů) nebo Slovenské Republiky (u slovenských členů), nebo jestliže jeho jednání je v rozporu se stanovami GSGM.

(3) Řádný člen může být z GSGM vyloučen také pro neplacení členských příspěvků, a to po dobu nejméně dvou let, přičemž byl v průběhu této doby alespoň jednou prokazatelně k zaplacení dlužných členských příspěvků písemně vyzván.

(4) O vyloučení člena jedná a rozhoduje výbor GSGM na základě odůvodněného písemného návrhu kteréhokoli člena GSGM, a to na svém nejbližším zasedání. Proti rozhodnutí výboru GSGM se člen může odvolat k nejbližšímu valnému shromáždění GSGM, které je povinno odvolání projednat a sdělit prostřednictvím výboru GSGM členovi svoje konečné rozhodnutí. Proti rozhodnutí valného shromáždění již není odvolání.

(5) Zánikem členství nevzniká nárok na vrácení již zaplacených členských příspěvků.

(6) Vyloučený řádný člen může znovu požádat o členství v GSGM nejdříve po třech letech od svého vyloučení.

(7) Čestné členství, které zaniklo dobrovolným vystoupením člena nebo jeho vyloučením (§ 7 odst. (1) písm. a/ nebo c/) již nelze obnovit.

## Samosprávné orgány GSGM

### § 8

(1) Samosprávnými orgány GSGM jsou:

- a/ plénum GSGM;
- b/ valné shromáždění GSGM;
- c/ výbor GSGM;
- d/ revizoři účtů GSGM.

(2) Plénum GSGM tvoří všichni členové GSGM. Plénum je nejvyšším samosprávným orgánem GSGM, který projednává, vyjadřuje se a rozhoduje o všech základních otázkách činnosti a existence GSGM. Do výlučné pravomoci pléna GSGM patří:

- a/ volba členů výboru GSGM;
- b/ volba revizorů účtů GSGM;
- c/ volba čestných členů GSGM;
- d/ schvalování stanov GSGM a jejich příp. změn, úprav a doplňků;
- e/ schvalování výše členských příspěvků GSGM;
- f/ schvalování příp. návrhu na zrušení GSGM.

(3) Ke všem bodům uvedeným v § 8 odst. (2) písm. a/ až f/ se plénum GSGM vyjadřuje tajným hlasováním, a to písemnou anonymní formou, kterou určí výbor GSGM. Příslušný návrh, o němž plénum hlasovalo, se pokládá za schválený, jestliže pro něj hlasovalo více než 50 % hlasujících členů GSGM, přičemž se hlasování musí zúčastnit alespoň 50 % všech členů GSGM.

(4) Valné shromáždění GSGM je svoláváno výborem GSGM podle potřeby, nejméně však jednou za tři roky. Výbor GSGM je kromě toho povinen svolat valné shromáždění, požádá-li o to nejméně 10 % členů GSGM. Na každé valné shromáždění musí být pozváni všichni členové GSGM. Valné shromáždění pak představují ti členové GSGM, kteří se ho osobně zúčastnili, přičemž ve svém souhrnu na tomto valném shromáždění musí tvořit nejméně 10 % veškerého členstva GSGM. Za této podmínky je valné shromáždění GSGM usnášeníschopné a může právoplatně hlasovat.

(5) Písemné pozvánky na valné shromáždění musí obsahovat navržený program jednání a všechny příslušné návrhy, které výbor GSGM předkládá valnému shromáždění k projednání a schválení. Pozvánky musí obdržet všichni členové GSGM nejméně dva měsíce před vlastním zasedáním valného shromáždění.

(6) Do výlučné pravomoci valného shromáždění GSGM patří projednávání a schvalování:

- a/ zprávy o činnosti výboru GSGM za uplynulé funkční období;
- b/ zprávy revizorů účtů GSGM o hospodaření společnosti v uplynulém tříletém období od posledního zasedání valného shromáždění GSGM;
- c/ zásad a základních směrů činnosti GSGM pro následující funkční období;
- d/ rozpočtu GSGM pro následující funkční období;
- e/ návrhů na členy výboru GSGM na následující funkční období (o nichž pak následně hlasuje plénum GSGM, viz § 8 odst. (2) písm. a/);
- f/ návrhů na příp. změny, úpravy a doplňky stanov GSGM (o nichž pak následně hlasuje plénum GSGM, viz § 8 odst. (2) písm. d/).

(7) K bodům uvedeným v § 8 odst. (6) písm. d/ a e/ se na valném shromáždění hlasuje tajně. Příslušný návrh se pak pokládá za schválený, pokud pro něj hlasovalo více než 50 % přítomných členů GSGM.

(8) Výbor GSGM je organizačním orgánem, který organizuje a řídí činnost společnosti. Výbor GSGM se skládá z předsedy, tří místopředsedů, tajemníka, hospodáře, výkonného redaktora informačního bulletinu a dalších pěti členů. Do těchto funkcí jsou členové výboru voleni tajným hlasováním výborem GSGM.



(9) Funkční období výboru GSGM je tříleté.

(10) Výbor GSGM se schází nejméně dvakrát ročně. Jeho hlavní činností je:

a/ organizace a řízení činnosti GSGM podle zásad a hlavních směrů činnosti i společnosti schválených valným shromážděním GSGM;

b/ organizace a příprava seminářů, celostátních vědeckých konferencí a dalších celospolečenských akcí GSGM;

c/ příprava programu a svolávání valného shromáždění GSGM;

d/ projednávání a příprava návrhů pro valné shromáždění GSGM podle § 8 odst. (5);

e/ příprava a předkládání návrhů, schválených valným shromážděním, plénu GSGM;

f/ projednávání, schvalování a tematická příprava náplně jednotlivých čísel informačního bulletinu GSGM a organizační zajištění jeho vydávání;

g/ vedení účtů GSGM a hospodaření s finančními prostředky GSGM podle rozpočtu schváleného valným shromážděním.

(11) Revizoři účtů GSGM dohlíží na hospodaření s finančními prostředky GSGM. Pro dané funkční období jsou plénem GSGM voleni vždy dva revizoři (jeden za Českou Republikou a druhý za Slovenskou Republikou). Za svou činnost se zodpovídají valnému shromáždění GSGM, kterému předkládají svou zprávu o hospodaření GSGM v daném funkčním období. Ve svojí revizní činnosti se řídí právními předpisy, obecně platnými v České Republice a ve Slovenské Republice. Jejich funkční období je tříleté.

## **Právní postavení, majetek a hospodaření**

### **§ 9**

(1) Statutárním zástupcem GSGM je předseda výboru GSGM, který může pro jednotlivé dílčí úkoly, vyplývající z této funkce, písemně pověřit některého z dalších členů výboru GSGM.

### **§ 10**

(1) K materiálnímu zabezpečení činnosti GSGM slouží:

a/ členské příspěvky;

b/ dotace;

c/ dary a dědictví;

d/ zisky z vlastní činnosti GSGM, zejména z pořádaných vědeckých akcí.

(2) Za hospodaření GSGM, za dodržování finančních předpisů a kontrolu účetních dokladů, za čerpání prostředků v souladu s obecně platnými zákonnými předpisy a rozhodnutími výboru GSGM odpovídá hospodář výboru GSGM.

(3) V případě zániku GSGM rozhoduje o majetkovém vypořádání příslušná likvidační komise GSGM, která bude k tomu účelu jmenována plénem GSGM.

## ***Přechodná a závěrečná ustanovení***

### **§ 11**

(1) Tyto stanovy nabývají účinnosti dnem registrace GSGM.

(2) Kterýkoli člen GSGM má právo předkládat návrhy a podněty na změny, úpravy a doplňky ve stanovách GSGM. Svůj návrh podává písemně výboru GSGM, který je povinen jej projednat

na svém nejbližším zasedání a následně jej se svým vyjádřením předložit k projednání a ke schválení nejbližšímu valnému shromáždění GSGM, které připraví konečný návrh těchto změn pro jeho předložení a schválení plénem GSGM. Změny stanov schválené plénem GSGM jsou pak výborem GSGM oznámeny ve smyslu § 11 odst. (1) zák.č. 83/1990 Sb. Ministerstvu vnitra České republiky a nabývají účinnosti dnem, kdy toto ministerstvo písemně oznámí, že je bere na vědomí.

(3) Toto znění stanov připravil a schválil výbor GSGM dne 24. 5. 2000, projednalo a schválilo valné shromáždění GSGM dne ....., a schválilo plénum GSGM dne .....

# Co nového v genetice

## Terminálne diferencované tkanivo *Drosophila melanogaster*: model pre mechanizmus regulácie génovej expresie pri diferenciácii eukaryotických buniek

Robert FARKAŠ

Laboratórium genetiky, Ústav experimentálnej endokrinológie, Slovenská akadémia vied,  
Vlárska 3, 83306 Bratislava

### 1. Úvod

Hoci ovocná muška *Drosophila melanogaster* sa stala modelovým objektom genetiky už začiatkom 20. storočia, k nezvyčajne búrlivej exploatácii jej výskumu v šak došlo až od druhej polovice 70 -tych rokov, najmä zásluhou p ostupného hromadenia niekoľkých kľúčových metód a techník výrazne uľahčujúcich a nalýzu vývojových procesov zvlášť u embryí (Lewis a Bacher, 1968; Limbourg a Zalokar, 1973; Zalokar, 1981; Wieschaus a Nusslein-Volhard, 1986). Popri rozmachu štúdia embryogenézy a identifikácie génov esenciálnych pre determináciu A-P a D-V osi, segmentáciu a organogenézu (Sandler a kol., 1968; Lewis, 1978; Nüsslein-Volhard a Wieschaus, 1980; Jürgens a kol., 1984; Nüsslein-Volhard a kol., 1984; Wieschaus a kol., 1984; Schüpbach a Wieschaus, 1986) sa intenzívne skúmal proces odozvy pufov (lokálnych dekondenzácií euchromatínu, kde prebieha intenzívna transkripcia (Pelling 1959; Berendes, 1972)) v polyténnych chromozómoch na steroidný hormón ekdyzon (obr. 1), ktorý riadi larválne zvliekania, metamorfózu i fertilitu imág. Clever a Karlson (1960) injikáciou ekdyzonu do lariev pakomárov *Chironomus* na konci posledného instaru dosiahli indukciu pufov identických s tými, ktoré sa objavujú *in vivo* tesne pred metamorfózou. Následne Clever (1964) a Clever a Romball (1966) v pokusoch s proteosyntetickými a transkripčnými inhibítormi ukázali, že medzi tzv. skorými na ekdyzon rýchlo reagujúcimi pufmi a stredne neskorými či veľmi neskorými pufmi je určitá závislosť, pričom neskoré pufy sa neobjavujú bez indukcie skorých lokusov a sú dokonca závislé od expresie génov v skorých pufoch. Týmito prácami bolo po prvý krát ukázané, že steroidné hormóny môžu p ôsobiť priamo na gény a položili sa základy štúdia molekulárneho mechanizmu účinku steroidných, tyroidných a retinoidných hormónov u stavovcov. Aj keď mechanizmus účinku malých lipofilných ligandov je už desiatky rokov intenzívne študovaný a identifikácia prvých nukleárných receptorov na krátky čas predbehla výskum u *Drosophila*, muší model dodnes poskytuje jeden z najvhodnejších systémov pre analýzu interakcie hormonálne riadených génov vzhľadom na ich úlohu p ri diferenciácii buniek a v terminálnych fázach vývoja jedného tkaniva. Larválne slinné žľazy *Drosophila* s obrovitými polyténnymi chromozómami sú takýmto terminálne diferencovaným a na hormón ekdyzon veľmi citlivým tkanivom, k de môžeme pomerne jednoduchou cytogenetickou technikou sledovať priebeh zmien v aktivite navzájom hierarchicky interagujúcich génov. Práve tomuto momentu by sme chceli venovať pozornosť v nasledujúcich kapitolách príspevku.

### 2. Pufy a puffing na polyténnych chromozómoch

Pre svoje nepochybné výhody voči iným druhom hmyzu, analýza pufov na polyténnych chromozómoch larválnych slinných žliaz *Drosophila* sa dočkala najväčšej pozornosti už na počiatku výskumu vzťahu ekdyzon -gény. Becker (1959, 1962) popísal výskyt pufov na ľavom ramene 3. chromozómu p očas puparizácie a dokázal závislosť ich indukcie od vylúčenia ekdyzonu z protorakálnych žliaz na konci posledného larválneho instaru. V priebehu viacerých rokov potom Ashburner (1967, 1969, 1971, 1972b,c) doplnil Beckerove práce a skompletizoval celú sekvenciu

vyskytujúcich sa pufov od konca posledného larválneho instaru až po zánik slinných žliaz na konci prepupálneho obdobia. Identifikoval celkovo 193 pufov, ktorých výskyt rozdelil do 21 štádií (PS1-PS21) pokrývajúcich posledných približne 24 hod života slinnej žľazy (Ashburner, 1972a; Ashburner a Berendes, 1978). Polyténne chromozómy slinných žliaz sa stávajú technicky použiteľnými pre štúdium pufov v druhej polovicike posledného t.j. 3. larválneho instaru, keď u nich prebieha tzv. interekdyziálne štádium charakterizované výskytom nízkeho počtu prominentných pufov 3C11, 25B, 68C, 90B5, ktoré nesú skupinu génov kódujúcich funkčne príbuzné sekretorické proteíny (salivary glue secretion; Sgs) slúžiace po vylúčení do lúmenu a ďalej cez ústny otvor ako lepidlo na uchytenie pupária k podkladu. Indukcia týchto pufov a expresia v nich uložených Sgs génov je pod koordinovanou kontrolou veľmi nízkeho ale stabilného titru hormónu ekdyzonu v cirkulácii počas tohto obdobia (DeReggi a kol., 1975; Richards, 1981). Interekdyziálna fáza trvá 16 – 18 hod a je doprevádzaná tvorbou veľkých sekrečných granúl neskôr vyplňujúcich celú cytoplazmu buniek slinných žliaz (obr. 2). Ukončenie interekdyziálneho obdobia nastáva prudkým zvýšením endogénnej hladiny ekdyzonu, ktoré zastaví príjem potravy, „vyženie“ larvy zo živnej pôdy a spôsobí ich zdanlivo bezcieľne putovanie asi na 4 – 5 hod, ktorého účelom však je nájsť si vhodné miesto k puparizácii pokiaľ možno čo najďalej od vlhkej až kvapalnej pôdy; tu sa práve uplatní lepivý glej zo slinných žliaz a zabráni aby imobilné puparium či kukla spadli do kvapalnej pôdy. Zvýšený titer ekdyzonu v prvom rade vyvolá na polyténnych chromozómoch rýchlu indukciu tzv. skorých pufov na lokusoch 2B5, 23E, 63F, 74EF, 75B a regresiu interekdyziálnych pufov 3C11, 25B, 68C, 90B5 (obr. 3). Aktivácia génov na skorých lokusoch, z ktorých ako prvé behom 10-15 min reagujú 74EF a 75B, spojená s regresiou interekdyziálnych pufov 3C11 a 68C je považovaná za prechod zo štádia PS1 do PS2. V priebehu prvých 4 hodín zvýšenej hladiny ekdyzonu počas ktorého sa dosiahne štádium PS4 skoré pufy 74EF a 75B sa zväčšujú a dosahujú svoju maximálnu veľkosť, následne čoho začnú podliehať pomalej regresii. Medzitým, počas štádia PS2, sa objavujú ešte sekundárne skoré pufy na lokusoch 50CD, 71DE, 83E a 93D (obr. 4) a v štádiu PS3 pribudnú pufy 58DE, 72D a 96E (Ashburner, 1972b,c). Počas PS4 regresuje puf 10EF, ktorý patrí medzi málo aktívne v interekdyziálnej perióde a ako nový sa aktivuje 62E. V čase PS5 keď začína sekrecia Sgs proteínov do lúmenu žľazy (obr. 2), regresuje predtým málo výrazný puf 16A, ktorý sa objavuje na konci PS2 a aktivujú sa nové pufy 55E, 67B a 70C. V štádiu PS6 nedochádza k žiadnej regresii, ale naopak, aktivujú sa tzv. pozdne skoré pufy 12E, 16DE, 21F, 33E a 78D a rapídne sa zväčšujú 50CD, 62E a 63F. Štádium PS7 je charakteristické aktiváciou 10EF, 29F a 98F. Puf 63F začína regresovať a 78D sa evidentne zväčšuje. Počas PS8 sa povedľa veľmi aktívneho 2B5 objavuje puf 3A, zväčšujú sa 23E, 33E, 47A, 85F a 88D. Puf na lokuse 34A sa stáva inaktívny. Prechodom do štádia PS9, kedy sa jedinec stáva imobilnou larvou, aktivujú sa tzv. neskoré pufy 8D, 9EF, 36E, 63E 66B a zväčšujú sa 10EF, 21F, 22C, 71DE, 72DE, 82F a 98F (obr. 4). V štádiu PS10 keď vzniká prepupa a nastáva expektorácia gleja zo slinných žliaz, regresuje puf 2B5 a svoju veľkosť zväčšujú 9EF, 11B, 12E, 63E a naopak, úplne miznú skoré pufy 74EF a 75B. Počas PS11 sa zvyšuje aktivita na lokusoch 2E, 3A, 29F, 66B a 91D a regresujú pufy 42A, 43E, 44AB, 76B a 95F. Ako nové sa vtedy objavujú pufy 7D, 25D a 61C. V období PS12 regresujú 3A, 12E, 21F, 22C, 23E, 63E, 82F, 88D a 98F. Súčasne sa zväčšuje priemer pufov 39BC, 46F, 58D a 93D. Štádium PS13 sa vyznačuje zväčšením puflu v lokuse 4F, znovuobjavením sa puflu 75B, vytvorením nového puflu 76D a regresiou pufov na lokusoch 2EF, 29F a 66B. V ďalšom štádiu, t.j. v PS14 sa zmenšujú pufy 4F a 39BC, zatiaľ čo puf 93D regresuje a *de novo* sa aktivuje lokus 99E. V štádiu PS15 sa výrazne zvyšuje aktivita na lokusoch 58DE, 59F, 60B a 90BC; regresii podliehajú pufy 76D a 83E. V PS16 regresujú 2EF, 4F, 96E a 99E. V tom istom čase sa aktivujú pufy na lokusoch 15C, 52AC, 63E, 100DE a markantne sa zväčšuje puf 85DF. Počas PS17 zostávajú aktívne pufy z predošlého PS a intenzívne sa aktivujú 36F, 43E, 50CD a klesá aktivita 59EF a 60B. V štádiu PS18 sa zväčšuje priemer puflu 63E a *de novo* sa aktivuje puf 69A. Vstupom do štádia PS19 rastie aktivita na lokusoch 2B-EF, 13E, 22A, 23B, 32C, 33E, 66B, 74EF, 75B-CD, 93F a 96E, z ktorých mnohé boli predtým málo výrazné. V predposlednom štádiu, t.j. v PS20 sa okrem regresie 60B a 74EF kvalitatívne nemenia žiadne pufy v porovnaní s PS19; u niektorých sa však čiastočne mení veľkosť. V období PS21 prudko regresujú pufy 3C, 39BC a 50CD; zvýši sa aktivita lokusov 26B, 29BC, 62E a 88D. Na 4. chromozóme sa vyskytne puf 102A. Po štádiu PS21 sa vývin slinných žliaz končí kompletnou histolýzou, ktorej prvé náznaky sa objavujú v PS15 -16 (Ashburner, 1972a; Ashburner a Berendes, 1978; Farkaš, 1991).

## 2.1. Regulačné vzťahy v rámci puffingu - sekvenčná aktivácia génov

Veľkou prednosťou opísaného modelu je možnosť kultivovať slinné žľazy v chemicky definovanom médiu *in vitro* a iniciovať zmeny puffingu identifikované s tými, ktoré boli pozorované *in vivo* iba pridaním ekdyzonu (Ashburner, 1972b; Farkaš a Šuťáková, 1998). To utvorilo príležitosť k uskutočneniu experimentov, o ktorých by sa nedalo v kontexte *in vivo* uvažovať. Zásadným bolo zistenie, že ak sa larvám PS1 štádia podá či do kultivačného média s prítomným ekdyzonom k slinným žľazám pridá proteosyntetický inhibítor (cykloheximid alebo puromycin), aktivácia skorých pufov síce nastane, ale interekdyziálne puфы 3C11, 25B, 68C budú regresovať iba čiastočne a veľmi pomaly a najmä nedôjde k aktivácii stredných a neskorých pufov, ba dokonca ani k programovej regresii primárne indukovaných skorých pufov 74EF a 75B (Ashburner, 1973, 1974; Farkaš, 1991). Z toho vyplynulo, že skoré puфы 2B5, 63F, 74EF a 75B zrejme kódujú regulačné proteíny, najpravdepodobnejšie transkripčné faktory, ktoré sú dôležité pre tvorbu neskorých pufov, pre regresiu pufov na interekdyziálnych lokusoch ako aj pre vlastnú autoreguláciu. Preto sa proces pravidelného a reprodukovateľného objavovania pufov na polyténnych chromozómoch účinkom steroidného hormónu nazval sekvenčnou aktiváciou génov, ktorá viditeľne odráža priebeh vývinových zmien v organizme. Na základe týchto poznatkov Ashburner a kol. (1974), Ashburner (1990) vytvorili model hierarchických vzťahov medzi ekdyzonom a ním regulovanými génmi, ktorý vyjadroval pomerne jednoduchý princíp inducibility skorých lokusov a dvojitej regulácie neskorých lokusov daný jednak inhibíciou ich predčasnej indukcie priamym pôsobením komplexu ekdyzon-ekdyzonový receptor a na druhej strane daný ich aktiváciou produktami skorých génov (obr. 5). Žiaľ tento model nevysvetľoval všetky dovtedy známe vzťahy medzi pufovi, neanticipoval už známy ale nevyjasnený výskyt niektorých pufov, opomenul možnosť že medzi skorými indukčnými lokusmi môžu byť aj efektorové a nie regulačné gény a naopak medzi veľmi neskorými pufovi môžu existovať tiež lokusy s regulačnou úlohou.

Významným doplnením modelu bola rada experimentov, v ktorých Ashburner a Richards (1976) a Richards (1976a,b,c) za využitia už spomenutých *in vitro* podmienok ukázali, že odstránenie ekdyzonu z média po 4-5 hod inkubácii slinných žliaz bez toho, aby počas iniciálnej fázy prekonal autonómu regresiu primárne indukovaných pufov 74EF a 75B, vedie k prematurálnej aktivácii neskorých a veľmi neskorých larválnych pufov bez výskytu pufov v strednej fáze. Zaujímavé ale je, že akcelerácia výskytu pufov nemá za následok žiadnu akceleráciu vo vývoji fyziológie slinnej žľazy (Farkaš a Šuťáková, 1998). Nemenej zásadným bolo zistenie, že kontinuálna kultivácia slinných žliaz v médiu s permanentne prítomným ekdyzonom umožní aby sa dostali vo vývine maximálne do štádia PS13/14, kde sa progresia puffingu zastaví. Pozoruhodné je, že kontinuitu sekvenčnej aktivácie génov *in vitro* je možné docieľiť resp. obnoviť prenesením slinných žliaz do intaktného média aspoň na 3 hodiny a potom opätovným pridaním ekdyzonu. Vtedy je možné pozorovať pokračovanie prepupálneho puffingu až do štádia PS21.

Pri predčasnom odstránení ekdyzonu po iniciálnej 3-5 hod inkubácii primárne indukčnými pufovi 74F a 75B regresujú pomerne rýchlo ako následok permanentnej potreby ligandu k udržaniu ich aktivity. Ale po opätovnej aplikácii hormónu sú puфы 74F a 75B čiastočne reaktivovateľné. Pri skrátení iniciálnej periódy je možné pozorovať insuficientnú aktiváciu ďalších lokusov, prípadne insuficientnú represiu interekdyziálnych lokusov. Možnosť reindukcie skorých pufov 74EF a 75B závisí na dĺžke prvej inkubácie s ekdyzonom. Táto možnosť reindukcie je limitovaná inkubáciou trvajúcou približne 5 hod. Ukázalo sa, že puфы 74EF a 75B sa stávajú progresívne refrakčné k reindukcii po 3 hod expozície na ekdyzon a 2 hod inkubácie v intaktnom médiu. Predĺženie indiferentnej periódy z 2 na 4 hod nijak neovplyvnilo výsledok reindukcie. Naproti tomu, predĺženie iniciálnej inkubácie s ekdyzonom z 3 hod na 4 až 5 hod pozitívne ovplyvnilo vývoj refrakčnosti. Z toho plynie, že významnými sú prvé 3 hod inkubácie s hormónom. Použitie puromycínu a cykloheximidu ukázalo, že vznik refrakčnosti je podmienený proteosynteticky, lebo oba primárne responzívne puфы je možné reindukovať opätovným pridaním ekdyzonu aj v prítomnosti inhibítorov translácie. Walker a Ashburner (1981) za využitia aneuploidov pre lokusy 74EF a 75B poukázali na kvantitatívny charakter účinkovania ich produktov, kedy duplikácie týchto génov akcelerovali objavenie neskorých pufov i vlastnú represiu, kým deficiencie výrazne oddialili či zabránili týmto javom.

Inkubácia slinných žliaz štádia PS 1 po dobu 12 alebo 24 hod v intaktnom médiu bez hormónu nevedla k žiadnym kvalitatívnym zmenám interekdyziálnych pufov. Časom sa ovšem dá pozorovať pozvoľná regresia pufov 3C a mierna regresia pufov 25B a 68C, čo naznačuje, že v absencii ekdyzonu slinné žľazy zrejme zotrávajú v štádiu PS1. Časovo nezávislá aplikácia ekdyzonu do média k takto udržiavaným slinným žľazám vždy navodila indukciu dvojice skorých pufov 74EF a 75B, následnej indukcie pufov 23E a 63F, a regresii interekdyziálnych pufov. Dva interekdyziálne pufové, 25B a 68C, následkom 1 hodinovej inkubácie slinných žliaz štádia PS1 v médiu s ekdyzonom regresujú ireverzibilne. Pokračovaním inkubácie v médiu či už s hormónom alebo bez neho sa viac nedosiahne reindukcia týchto interekdyziálnych pufov. Tretí z trojice výrazných interekdyziálnych pufov, 3C, začína regresovať počas inkubácie (t.j. v podmienkach *in vitro*) za 1 až 1,5 hod bez ohľadu na prítomnosť ekdyzonu. Avšak, keď regresia pufov 3C prebehla v prítomnosti ekdyzonu, pri prolongovanej inkubácii slinných žliaz v médiu s hormónom či bez hormónu, sa tento puf už viac neobjavuje. Ak ale puf 3C regresoval v absencii hormónu, tak je možné pozorovať jeho spontánnu reindukciu po 5 - 6 hod, nezávisle od štádia PS, v ktorom sa práve slinné žľazy nachádzali. Podľa týchto pozorovaní sa dá usúdiť, že puf 3C môže byť regulovaný skorými ekdyzon-inducibilnými génmi kondicionálne.

Ako už bolo naznačené vyššie, simultánna aplikácia hormónu a puromycínu zapríčinila, že po indukcie pufov 74EF a 75B nedochádzalo k programovej regresii na interekdyziálnych lokusoch 25B a 68C. Po inkubácii slinných žliaz štádia PS1 so samotným proteosyntetickým inhibítorom nastane regresia interekdyziálnych pufov asi po 3 - 4 hod, čo nasvedčuje na proteosynteticky dependentnú reguláciu medzi interekdyziálnymi lokusmi navzájom, alebo nutnosť permanentnej proteosyntézy pre udržanie štádia PS1.

Pri podaní ekdyzonu spolu s aktinomycínom D okrem neschopnosti formovať ekdyzon-inducibilné pufové 74EF a 75B, o niekoľko málo minút regresujú tiež interekdyziálne pufové. Regresia interekdyziálnych pufov v slinných žľazách štádia PS1 nastala taktiež po aplikácii aktinomycínu D bez hormónu. Výsledok tohto pokusu podporuje domnienku, že ekdyzon nepôsobí ako represor aktivity interekdyziálnych pufov priamo, ale zrejme prostredníctvom trans-účinkujúcich produktov ekdyzon-inducibilných, či prípadne iných zúčastnených génov. Tieto ako aj vyššie opísané experimenty poukázali na skutočnosť, že sekvenčnú aktiváciu génov na polyénnych chromozómoch nereguluje a priori len ekdyzon ale deje sa tak prostredníctvom ekdyzonom kontrolovaných génov resp. ich produktov, ktoré s najväčšou pravdepodobnosťou vchádzajú do komplikovaných interakcií s radom ďalších génov či ich produktov.

### **3. Pufové a ekdyzonom regulované gény**

Tento svojím spôsobom unikátny model pre štúdium regulácie génovej expície u eukaryontov a vzájomnej interakcie medzi exprimovanými génmi doslova volal po charakterizácii génov zodpovedných za tvorbu pufov. Medzi prvé ekdyzonom regulované a pufové tvoriace lokusy, ktoré boli klonované patria *Sgs* gény kódujúce skupinu sekrečných glykoproteínov, ktoré nemajú obdobu medzi ostatnými doteraz známymi proteínmi. Prvotná charakterizácia *Sgs* proteínov spočívala v izolácii ľahko získateľného sekretu vylúčeného do lúmenu žliaz a ich elektroforetickej separácii, kde sa detekovalo 6-7 proteínových pásov (Korge, 1975; Beckendorf a Kafatos, 1976). Variabilná veľkosť týchto proteínov ako aj schopnosť inkorporovať radioaktívne značenú glukózu (Kress, 1977; Enghofer a Kress, 1980) naznačili, že aspoň niektoré z nich, ak nie všetky, sú glykozylované. Nízky počet chromozomálnych lokusov v čase syntézy *Sgs* proteínov utvárajúcich pufové umožnil určiť ich chromozomálnu lokalizáciu (Korge, 1977a,b; Ashburner a Berendes, 1978; Vellissariou a Ashburner, 1980, 1981). Krátko na to logicky nasledovalo klonovanie chromozomálneho klasteru 68C kódujúceho gény *Sgs-3*, *Sgs-7* a *Sgs-8* (Meyerowitz a Hogness, 1982; Crowley a kol., 1983, 1984; Crowley a Meyerowitz, 1984; Crosby a Meyerowitz, 1986), pufov tvoriaceho lokusu 3C zodpovedného za transkripciu *Sgs-4* génu (Muskavitch a Hogness, 1980, 1982; Chen a kol., 1987) a klonovanie pufov 95B nesúceho gén pre *Sgs-5* (Guild, 1984; Guild a Shore, 1984). Až nedávno bolo oznámené úspešné klonovanie génu *Sgs-1* z lokusu 25B (Roth a kol., 1999). Sekvenčná analýza ukázala, že unikátne črty *Sgs* proteínov sa nenachádzajú medzi doteraz známymi proteínmi v databázach a sú zrejme spojené s ich sekretorickou a glej tvoriacou povahou. Jedná sa predovšetkým o neobvykle vysoký obsah Thr, Lys, Cys a Pro u *Sgs-3* a *Sgs-4* a obsah Ser u *Sgs-5* vo frekventovane opakovaných po sebe

nasledujúcich tandemoch. Hoci silná glykozylácia sa očakávala u všetkých z nich, najprv len u Sgs -3 sa našli motívy umožňujúce nespochybniteľnú p redikciu glykozylácie (Garfinkel a kol., 1983). S pokrokom znalostí i vývojom softwaru bolo možné detailnou sekvenčnou analýzou pripísať zjavné glykozylačné atribúty aj proteínu Sgs -4 (Furia a kol., 1992), a pochopiteľne aj Sgs -1 (Roth a kol., 1999). Tu treba podotknúť, že sekrečná a tým extracelulárna povaha Sgs proteínov ich jednoznačne vylúčila z účasti na procese sekvenčnej aktivácie génov.

Až molekulárna analýza lokusov zodpovedných za tvorbu p ufov 7 4EF a 75B priniesla prvé podporné dôkazy pôvodného modelu Ashburnera a kol. (1974), ktorý sme spomenuli vyššie. Janknecht a kol. (1989) a Burtis a kol. (1990) izolovali metódou "chromosomal walking" viacero genómových klonov súhrne čítajúcich niekoľko stoviek kb DNA z oblasti pufov 74EF, ktorá obsahuje tri transkripčné jednotky s tromi unikátnymi promotormi a jedným spoločným polyadenylačným signálom. Ekdyzonom indukovanú oblasť označili ako komplexný ekdyzon -inducibilný gén *E74*, ktorý v skutočnosti obsahuje dva gény, *E74A* a *E74B*. Gén *E74A* obsahuje jednu 60 kb dlhú transkripčnú jednotku, na ktorej vzniká 6,0 kb mRNA s nezvyčajne dlhým 5' leaderom a so 7 krátkymi otvorenými čítacími rámcami (ORF). Vo vnútri piateho zo siedmich intrónov *E74A* génu sú umiestnené tesne vedľa seba (vo vzdialenosti iba 8 bp) dva promotory génu *E74B*, ktoré určujú syntézu dvoch mRNA o veľkosti 4,8 a 5,1 kb. Teda gén *E74B* leží vo vnútri génu *E74A*, pričom obidve jeho transkripčné jednotky sa začínajú v nekódujúcej oblasti génu *E74A*. Komplexný ekdyzon-inducibilný gén *E74* kóduje syntézu dvoch proteínov. Z transkripčnej jednotky *E74A* pochádza proteín s 829 aminokyselinami (molekulová hmotnosť 87,1 kD). Vzhľadom na krátku vzájomnú vzdialenosť dvoch promotórov a napriek dvom veľkostne odlišným mRNA, gén *E74B* kóduje syntézu jedného proteínu s 883 aminokyselinami (94,7 kD). Burtis a kol. (1990) ďalej zistili, že oba proteíny majú unikátne na kyslé aminokyseliny bohaté N-terminálne domény ale spoločnú C-terminálnu sekvenciu, čo je dané tým, že po sledné tri ORF *E74B* génu sú spoločné s *E74A* genom. C-terminálna doména, ktorá zaberá asi 2/3 dĺžky oboch proteínov obsahuje mnoho bázičných aminokyselín a je veľmi podobná proteínom kódovaným superfamíliou *ets* proto-onkogénov, najmä však *ets* erytroblastického vírusu E26, čo je výrazným náznakom, že práve tento úsek oboch *E74* proteínov je kandidátom pre DNA viažúcu doménu súčasne obsahujúcu i jadrový lokalizačný signál (NLS). Tak *E74* proteíny spĺňajú kritériá pre funkciu transkripčných faktorov.

Feigl a kol. (1989) a takmer súčasne aj Segreves a Hogness (1990) izolovali 50 kb dlhý gén *E75*, ktorý je zodpovedný za skorý pufof 75B. Podobne ako gén *E74*, aj gén *E75* je komplexný a skladá sa z dvoch jednotiek, *A* a *B*. Jednotka *E75A* obsahuje šesť exónov, z ktorých prvé dva, *A0* a *A1*, sú unikátne pre túto jednotku, kým zvyšné štyri sú spoločné pre obe transkripčné jednotky. Jednotka *E75B* má dĺžku 20 kb a obsahuje päť exónov, pričom prvý z nich, *B1*, je unikátny a nachádza sa vo vnútri druhého intrónu jednotky *E75A*. Preto gén *E75* kóduje dva odlišné proteíny, ktoré vykazujú sekvenčnú homológiu k evolučne konzervovaným DNA -viažúcim a hormón -viažúcim doménam proteínov patriacich do veľkej rodiny steroidných/retinoidných/tyroidných/ /prostaglandínových/vitamín D<sub>3</sub> receptorov. Proteín *E75A* obsahuje dva susediace Zn-prstové úseky tvoriace funkčnú DNA -viažúcu doménu kódovanú exónmi *A1* a *A2*, kým proteín *E75B* obsahuje len jeden Zn-prstový úsek, ktorý s najväčšou pravdepodobnosťou stratil schopnosť viazať sa k DNA. Obidva proteíny obsahujú tú istú ligand či hormón -viažúcu doménu kódovanú spoločným exónom 4. Proteín *E75A* sa skladá z 1237 aminokyselín (molekulová hmotnosť 132 kD) a *E75B* proteín z 1394 aminokyselín (molekulová hmotnosť 151 kD). Dodnes *E75* proteíny radíme k tzv. orfaným receptorom, ku ktorým nepoznáme ligand, čo ale nevylučuje, že ligand majú resp. sú schopné fungovať aj bez ligandu.

Tretím molekulárne charakterizovaným regulačným pufofom bol lokus 2B5, ktorý bol už dávno známy pod názvom *Broad-Complex (BR-C)* a existovali o ňom pomerne bohaté genetické znalosti siahajúce až do prvej polovice 20. storočia (Waddington, 1939). Tento lokus obsahuje 3 vzájomne komplementujúce skupiny letálnych aliel označované ako *broad (br)*, *reduced bristles on palpus (rbp)*, a *l(1)2Bc* (Belyaeva a kol., 1987; Kiss a kol., 1988) pričom štvrtou ale nekomplementujúcou skupinou sú tzv. *non-pupariating (npr)* alely, ktoré sú deficientné vo všetkých komplementujúcich skupinách a spôsobujú letalitu dlho prežívajúcich lariev neschopných metamorfózy ba dokonca ani puparizácie (Belyaeva a kol. 1981; Crowley a kol., 1984). Na vzájomný vzťah medzi pufofom 2B5 a *BR-C* neupozorňovala len zhoda cytologickej polohy a genetickej mapy, ale najmä chýbajúci 2B5 pufof u všetkých *npr* aliel (Mortin a Lefevre, 1981; Zhimulev a kol. 1982). O klonovanie tohto lokusu sa zaslúžili DiBello a kol. (1991), ktorí zistili že niekoľko cDNA reprezentujúcich tento lokus pochádza z

asi 100 kb dlhého genomického úseku kódujúceho minimálne 4 základné izoformy BR-C proteínov označených Z1 až Z4, z ktorých Z1 má aspoň 3 odlišné subformy. Všetky 4 izoformy majú spoločnú N-terminálnu až stredovú časť molekuly nazvanú "BR Core" región prítomný u všetkých členov tzv. BTB-rodiny transkripčných faktorov a kódovanú spoločným 1,7 kb exónom. BR -C Z1 až Z4 proteíny sa odlišujú v C-terminálnej oblasti pozostávajúcej z jednej zo 4 foriem Zn-prstového motívu kombinovaného ešte s ďalšou unikátnou časťou charakterizovanou zvýšeným výskytom určitých aminokyselín. Variabilita samotnej Z1 izoformy je daná prítomnosťou jedného či kombináciou rôznych adjacných úsekov pozostávajúcich zo špecifických skupín aminokyselín. Z1 až Z4 domény kvôli prítomnosti Zn-prstových motívov sú zodpovedné za DNA-viažúci charakter BR-C proteínov.

Nepochybne nepostrádateľným komponentom signálnej dráhy ekdyzonu je jeho vlastný receptor, ktorý označujeme EcR a je kódovaný génom *EcR* tvoriacim malý puf 42A. Jeho klonovanie umožnilo využitie vysoko konzervovanej sekvencie v DNA viažúcej domény všetkých dovtedy známych steroidných receptorov, ktorá sa použila k hybridizácii pri čiastočne zníženej stringencii s cDNA a genomickými knižnicami *Drosophila* (Koelle a kol., 1991). Gén *EcR* patrí opäť k veľkým génom s komplexnou štruktúrou a kóduje 3 izoformy EcR označené ako EcR -A, EcR-B1 a EcR-B2 líšiace sa len krátkou N-terminálnou časťou nesúcou podstatnú zložku transaktivačnej domény. Centrálnu DNA-viažúcu doménu, ligand -viažúcu doménu s dimerizačnou oblasťou i C -terminálnu časť majú všetky izoformy rovnakú (Talbot a kol., 1993).

Krátko po klonovaní *EcR* sa ukázalo, že samotný EcR proteín nie je postačujúci k transdukcii ekdyzonového signálu a nie je schopný ani viazať ekdyzon. Biologicky funkčný receptor je tvorený heterodimerným komplexom s proteínom Ultraspiracle (Usp) kódovaným génom *usp* z lokusu 3C11 (Yao a kol., 1992; Thomas a kol., 1993), ktorý je homológom ľudského retinoidného X receptoru, RXR (Oro a kol., 1990). Táto vlastnosť či "potreba" EcR i vysoká sekvenčná homológia Usp k RXR doprevádzaná funkčnou substituovateľnosťou u medzi Usp a RXR (Thomas a kol., 1993) jasne naznačila, že EcR patrí do kategórie tyroidných a vitamín D<sub>3</sub> receptorov vyžadujúcich heterodimerizačného partnera zo skupiny promiskuitných retinoidných receptorov. Na rozdiel od doteraz popisovaných génov, expresia *usp* sa nejaví byť ekdyzonom regulovaná a samotný *usp* kóduje syntézu len jedného polypeptidu Usp z jedného bezintronového otvoreného čítacieho rámca na asi 4 kb úseku DNA. Táto vlastnosť odlišuje *usp* od väčšiny ekdyzonom priamo regulovaných génov, ktoré sú komplexné a zaberajú aspoň 50 kb genomickej DNA čo indikuje možnosť ich zložitej multifaktoriálnej regulácie a ďaleko presnejšej temporálnej kontroly. Ak zväzíme tieto okolnosti, potom úloha ekdyzonu je redukovaná do "triggeru", ktorý spustí zložitý komplex navzájom koordinovaných reakcií vyúsťujúcich do realizácie alebo zmeny bunkového programu či zmeny bunkovej identity. Ale doposiaľ sme stále len na "počiatku" cesty realizácie jedného vývojového programu, ktorého exekúcia si vyžaduje mnohonásobne viac účastníkov, ktorých odhalenie identity nám môže aspoň čiastočne napomôcť pochopiť smer i cieľ tejto cesty. A kto sú teda ďalší účastníci? Než si odpovieme aspoň čiastočne na túto otázku, treba dodať, že kľúčová úloha doteraz 4 molekulárne charakterizovaných proteínov, EcR/USP, BR-C, E74 a E75, v iniciácii procesu sekvenčnej aktivácie génov bola silne podopretá dôkazom ich prítomnosti na početných lokusoch polyténnych chromozómoch, z ktorých mnohé tvoria pufy (Urness a Thummel, 1990; Hill a kol., 1993; Emery a kol., 1994; Farkaš, 1991).

Medzi ďalších účastníkov tejto veľkej hry patria aj 2 zvyšné skoré ekdyzon -inducibilné lokusy 23E a 63F, nesúce gény *E23* a *E63*, ktoré však nezapadajú do pôvodného modelu kontroly pufov, ale sú o to zaujímavejšie a napokon logické. V roku 1995 Andres a Thummel charakterizovali gén *E63* zodpovedný za skorý puf 63F kódujúci dva kalmodulínu podobné kalcium-viažúce efektorové proteíny, ktoré majú vrchol expresie tesne pred sekréciou v granulách skladovaných Sgs proteínov do lúmenu slinných žliaz. Ektopická expresia *E63* pod kontrolou tepelne-šokového promotora *hsp70* i v absencii ekdyzonu je postačujúca k stimulácii sekrécie slinných žliaz, čo dokazuje jeho funkciu v tomto procese (Andres, osobná informácia). Gén *E23* kóduje ABC transportér, ktorý je negatívnym regulátorom ekdyzonovej signalizácie, pretože jeho ektopická expresia redukuje akumuláciu ekdyzonu v tkanivách (Garza a kol., 2000). *E23* transportér takto predstavuje nový mechanizmus regulácie ekdyzonovej odozvy, nakoľko zasahuje aktívny transport steroidného hormónu do buniek. Analýza dynamiky priestorovej a temporálnej expresie *E23* naznačuje, že diferenciálna expresia a subcelulárna lokalizácia *E23* môže byť rozhodujúca pre moduláciu lokálnych hladín ekdyzonu a tým s a podieľať na tkanivovo-špecifickej odozve.



Klonovaním lokusu tvoriaceho jeden z prvých stredných pufov 78D sa charakterizoval ďalší nový člen veľkej rodiny nukleárných receptorov, *E78* (Stone a Thummel, 1993), ktorý má 2 do seba vnhniezené transkripčné jednotky. Väčšia z nich kóduje už spomínaný nukleárny receptor, a menšia jeho skrátenu verziu postrádajúcu DNA-viažúcu doménu. Fletcher a Thummel (1995) zistili, že expresia *E78* génu je temporálne posunutá počas metamorfózy u mutantov pre *E74* lokus, ktorý je tak priamym aj keď nie jediným regulátorom jeho transkripcie. Hoci gén *E78* nie je vitálny a jeho nulové alely nespôsobujú letalitu ani poruchy v reprodukcii, je nepostrádateľný pre maximálnu indukciu neskorých pufov v slinných žľazách (Russell a kol., 1996) a je možné ho považovať za jeden z tkanivovo-spezifických transkripčných faktorov ekdyzonovej kaskády.

Veľmi neskorým puфом larválneho cyklu je 75CD vznikajúci z génu *ftz-F1β*, ktorý kóduje ďalšieho člena superrodiny nukleárných receptorov, FTZ-F1β (Lavorgna a kol., 1991, 1993). Embryonálne špecifická izoforma, FTZ-F1α, kontroluje expresiu segmentačného génu *fushi tarazu* (*ftz*) a jeho mutácie, ktoré sú maternálne recesívne letálne, vedú k poruchám v diferenciácii a orientácii parasegmentov (Lavorgna a kol., 1991). Naproti tomu FTZ-F1β produkt zabezpečuje kompetenciu pre štádiovú-spezifickú odozvu na ekdyzon v počiatočných fázach metamorfózy. Hoci mechanizmus nadobudnutia tejto kompetencie nie je vyjasnený, expresia FTZ-F1β na prelome PS13 až PS14 štádii postačuje na ukončenie larválneho cyklu pufigu a vstup do repupálneho cyklu pufigu prechodom z PS14 do PS15, ktorý ako bolo spomenuté vyššie si vyžaduje dočasný pokles hladiny ekdyzonu (Lavorgna a kol., 1993). Ektopická expresia FTZ-F1β u lariev dostatočne dlho pred dosiahnutím PS13 je suficientná k získaniu tejto kompetencie prematurálne ak ju hodnotíme podľa možnosti opakovanej inducibility *E74* a *E75* génov ekdyzonom (Woodard a kol., 1994). Dodnes sa nepodarilo získať dôkaz o tom, či FTZ-F1β je tým kľúčovým faktorom, ktorý je rozhodujúci na prekonanie kulminačného bodu medzi štádiami PS13 a PS14 kde pri kontinuálnej kultivácii s ekdyzonom dochádza k zastaveniu vývoja pufov. Naproti tomu, FTZ-F1β je nesporne spoluzodpovedný za aktiváciu prepupálneho puflu 93F, ktorý vzniká z génu *E93* a kóduje netradičný typ transkripčného faktora (Woodard a kol., 1994; Baehrecke a Thummel, 1995), ktorého cieľové lokusy nie sú zatiaľ známe. *E93* sa exprimuje vo väčšine najmä larválnych tkanív v repupálnej perióde a jeho expresia predchádza programovej bunkovej smrti (PCD) tkaniva. V prípade slinných žliaz ektopická expresia *E93* postačuje na spustenie procesu PCD aj bez ekdyzonu či expresie *ftz-F1β* a reindukcie *E74* a *E75* génov (Baehrecke, osobná informácia).

Región 71DE, tvoriaci sekundárny skorý pufl, často nesprávne označovaný za neskorý larválny pufl, obsahuje klaster 11 vývojovo regulovaných génov, z ktorých 10 označovaných ako *L71-1* až *L71-10* vzniklo v evolúcii evidentne duplikáciou jedného ancestrálneho génu a sú zodpovedné za formáciu uvedeného puflu (Wright a kol., 1996). Preto všetky *L71* génové produkty spadajú do rodiny malých bázičských proteínov nesúcich konzervovanú cysteínovú kostru; funkcia týchto proteínov je zatiaľ neznáma. Jedenástym členom tohto lokusu je v interekdyziálnej perióde transkribovaný gén *I71-1*, ktorého proteín nesie charakteristiky čiastočne podobné Sgs polypeptidom ale ani jeho funkcia nie je doposiaľ objasnená; isté však je, že *I71-1* sa nezúčastňuje na tvorbe puflu 71DE. V súlade so závermi vyplývajúcimi zo štúdia sekvenčnej aktivácie pufov, transkripcia *L71* lokusu je závislá ako od produktov *BR-C* (Crossgrove a kol., 1996) tak aj *E74* génov (Fletcher a kol., 1997), ktoré majú svoje väzobné miesta v *cis* regulačných elementoch *L71* transkripčných jednotiek.

Neskorý larválny pufl 63E pochádza z transkripcie ďalšieho komplexného ekdyzonom regulovaného génu, *L63*, zaberajúceho vyše 85 kb genomickej DNA a obsahujúceho 3 prekrývajúce sa transkripčné jednotky *L63A*, *L63B* a *L63C* pričom jedna jednotka *A* kóduje 2 izoformy a jednotka *B* 3 izoformy *L63* proteínu (Stowers a kol., 2000). Z troch uvedených transkripčných jednotiek iba *L63B* je inducibilná ekdyzonom a vyžaduje *cis* sekvencie v promótoch pred *L63B* transkripčným štartom; vyradenie *cis* sekvencií z promótoch *L63A* jednotky nemá vplyv na expresiu a hormonálnu indukciu *L63B* jednotky. Všetky *L63* proteíny obsahujú spoločnú 294 aminokyselín dlhú C-terminálnu sekvenciu, ktorá vykazuje vyše 70% homológiu k cyklín dependentnej kinázovej (CDK) doméne myšacieho PFTAIRE proteínu (Sauer a kol., 1996). *L63A* aj *L63C* serín/treonín kinázy sú hojne prítomné v špecifických oblastiach embrya (primordium anteriórnej časti stredného čreva, CNS a gliové bunky), kým *L63B* proteíny sa exprimujú najmä u lariev na konci 3. instaru a u pupárií v mnohých tkanivách kde zrejme neplnia funkciu v kontrole bunkového cyklu. Komplexnosť aj expresný prejav *L63* génu, hoci kóduje efektorovú kinázu, ďaleko viac zodpovedá parametrom doteraz

známym len u skorých génov *E74*, *E75*, *BR-C*, a jednoznačne sa vymyká dnes už mechanistickým predstavám ekdyzonového modelu zo 70-tych rokov postavenom výlučne na simplifikovaných úvahách o priamych vzťahoch medzi pufmi.

V čase PS8 až PS11 štádií patrí medzi reprezentatívne neskoré larválne pufy euchrom atínový pás 82F, ktorý vzniká vďaka transkripcii z komplexného 50 kb lokusu *L82* produkujúcemu alternatívnym zostrihom 7 izoforiem *L82* proteínu (Stowers a kol., 1999). *L82* proteíny, tvoriace novú samostatnú rodinu pomerne veľkých polypeptidov s relatívnou molekulovou hmotnosťou nad 140 kD, vykazujú v N-terminálnej oblasti asi 50-54% homológiu k bližšie nešpecifikovanému proteínu z bunkovej steny niektorých baktérií a kvasiniek ale ich funkciu nie je možné dedukovať. Vzhľadom na expresiu rôznych *L82* izoforiem počas takmer celého vývoja vo viacerých tkanivách sa dá usudzovať, že *L82* gén nie je len pod kontrolou ekdyzonu, ale aj iných faktorov. Mutácie *L82* génu spôsobujú spomalenie vývoja a majú letálnu fázu u farátnych imág.

Na záver tejto kapitoly sa predsa len vrátíme na krátko späť k transkripčným faktorom. Izolácia *E75*, *EcR*, *ftz-F1β* a *E78* viedla k úsiliu klonovať aj ďalších členov superrodiny nukleárných receptorov na základe homológie v DNA-viažúcich doménach. To vyústilo do charakterizácie niekoľkých drozofilých hormonálnych receptorov (DHR). Prvým z nich je *DHR3* z lokusu 46F, ktorý tvorí veľmi nevýrazný larválny puf a kóduje klasický orfantný nukleárny receptor zúčastnený na kontrole rastu majúci svojich homológov medzi cicavcami vrátane človeka (Koelle a kol., 1992). *DHR3* receptor patrí k ekdyzonom indukovaným ale až v neskorších fázach larválneho pufového cyklu slinných žliaz a prispieva k represii skorých génov *E74* a *E75* (Horner et al., 1995; White a kol., 1997). *DHR3* okrem toho utvára spojnicu medzi skorou fázou odozvy na ekdyzon a neskorými pufmi priamou aktiváciou *ftz-F1β* génu, ktorý zabezpečuje nadobudnutie kompetencie pre prepupálny cyklus (White a kol., 1997; Lam a kol., 1997, 1999). Druhým členom tejto skupiny je *DHR38* pochádzajúci z ekdyzonom regulovaného lokusu 38E1, ktorý netvorí žiaden puf a kóduje orfantný nukleárny receptor homologický k cicavčiemu NGF -indukovanému B proteínu (NGFI-B) (Fisk a Thummel, 1995) schopnému heterodimerizovať s Usp a teda aj s RXR (Sutherland a kol., 1995). Hoci nepoznáme zatiaľ žiaden jeho cieľový gén, mutácie ukázali na jeho esenciálnu úlohu pri diferenciácii epidermy a najmä kontrole maturácie imaginálnej kutikuly (Kozlova a kol., 1998). Na susednom cytologickom lokuse 39C1 má svoj pôvod tretí z DHR receptorov, *DHR39*, ktorý bol na rozdiel od ostatných DHR členov klonovaný ako výsledok screeningu expresnej knižnice s oligonukleotidovou sondou korešpondujúcou k pozitívnemu elementu imaginálneho enhanceru alkohol dehydrogenázy (*Adh*) (Ayer a kol., 1993). *DHR39* proteín vykazuje štrukturálne aj funkčné vlastnosti veľmi podobné FTZ -*F1β* orfantnému receptoru. Kým FTZ-*F1β*, ktorý sa viaže k tej istej sekvencii, účinkuje ako aktivátor *Adh* transkripcie, *DHR39* reprimuje túto transkripciu. Ešte prekvapivejším bolo zistenie, že ako FTZ -*F1β* tak aj *DHR39* sa viažu v monomérskej podobe k oligonukleotidovej sekvencii zodpovedajúcej *ftz-F1β* rekogničnému elementu (FIRE) uloženému v "zebra" enhancery *ftz* promótoru (Ohno a kol., 1994). Posledným zo skupiny DHR, je gén *DHR96* pochádzajúci z lokusu 96B14 a kódujúci homológ vitamín-D<sub>3</sub> receptoru, ktorý má vrchol expsie u larvy a prepupy (Fisk a Thummel, 1995).

DHR receptory stále ešte neuzatvárajú plejádu nukleárných receptorov u *Drosophila*. Mierne odlišným orfantným nukleárnym receptorom než doteraz uvádzané je zygotický "gap" gén *knirps* (*kni*) pôvodne identifikovaný ako embryonálne letálny autozomálny lokus (Nüsslein-Volhard a Wieschaus, 1980; Nauber a kol. 1988), ktorý pozitívne reguluje včasnú embryonálnu expresiu už spomínaného segmentačného génu *ftz* (Carroll a Scott, 1986) a tak pôsobí korepetične k účinku FTZ -*F1α* a ekdyzonom regulovaného FTZ-*F1β*. *kni* pochádzajúci z chromozomálneho intervalu 77E2 má svojich homológov u myši aj človeka a u *Drosophila* interaguje s radom génov, medzi ktorými je gén pre epidermálny rastový faktor či ribozomálne proteíny.

Gén *seven up* (*svp*) bol pôvodne identifikovaný ako recesívna embryonálne letálna mutácia, ktorej niektoré alely umožňujú vývoj až p o imágo ale vyvolávajú transformáciu R1, R3, R4 a R6 fotoreceptorov v zloženom oku na fotoreceptor R7 (Mlodzik a kol. 1990). *svp* z lokusu 87B9 kóduje 2 orfantné nukleárne receptory homologické k stavovčím "chicken ovalbumin up stream promoter transcription factor" (COUP TF) proteínom esenciálnym pre morfogenezu určitých p artii CNS a fotoreceptorov (Mlodzik a kol. 1990). Hoci o priamej úlohe *Kni* v ekdyzonovej kaskáde nemáme

doposiaľ žiadne informácie, Svp je schopný heterodimerizovať s Usp a tak modulovať činnosť ekdyzonu už v prvých fázach odozvy (Zelhof a kol., 1995).

Posledným transkripčným faktorom, ktorý si spomenieme je nereceptorový a novo identifikovaný *Krüppel-homolog* (*Kr-h*) (Pecasse a kol., 2000), ktorý je príbuzným už od roku 1950 známeho embryonálne letálneho a dominantného génu *Krüppel* (*Kr*) kódujúceho špecifický s RNA polymerázou II kooperujúci transkripčný faktor majúci homológov u *Caenorhabditis elegans* i človeka. Pozoruhodné je, že okrem iných, *Kr* geneticky interaguje s tými istými ribozomálnymi proteínmi ako "gap" gén *kni*. *Kr-h* gén je opäť k omplexným lokusom mapujúcim do polohy 26B na polyténnych chromozómoch a nesúcim minimálne 2 nezávislé promótory dávajúce vzniknúť aspoň 3 transkriptom, *Kr-h $\alpha$* , *Kr-h $\beta$* , a *Kr-h $\gamma$* , z ktorých 4,5 kb *Kr-h $\alpha$*  transkript je nepostrádateľným pre normálnu progresiu metamorfózy a chýba aj u ekdyzon-deficientnej mutácie *ecd<sup>1</sup>* (vid' kap. 5.). Alely nesúce mutáciu v *Kr-h* géne majú letálnu fázu v prepupálnej resp. skorej kuklovej perióde kedy strácajú schopnosť ukončiť everziu hlavy, jeden z fenotypických znakov identifikujúcich h začiatok kuklového vývoja. Počas embryogenézy je dominantnou *Kr-h $\beta$*  izoforma, kým v larválnych slinných žľazách v čase prepupy je dominujúcou *Kr-h $\alpha$*  izoforma. *Kr-h<sup>1</sup>* mutácia zapríčiňuje v slinných žľazách predčasnú transkripciu EcRB1 a E74A izoforiem, oneskorený nástup expresie E75B proteínu a takmer úplne eliminuje expresiu E93 transkripčného faktoru.

S výnimkou génu *E63* sa väčšina doteraz charakterizovaných a intenzívne študovaných ekdyzon - responzívnych génov exprimuje v mnohých tkanivách p očas metamorfózy. Primárne inducibilné transkripčné faktory ako E74, E75, BR -C a samozrejme EcR, sa exprimujú dokonca v ten istý čas, i keď u EcR a BR -C ide o expresiu tkanivovo-špecifických izoforiem. Táto skutočnosť naznačuje, že primárna fáza reakcie na ekdyzon má charakter orgánovo koordinovanej odozvy na úrovni expresie génov a tkanivovo- či temporálne -špecifické charakteristiky odozvy sa začínajú realizovať až v neskorších fázach kedy zrejme dochádza k expresii druhej a tretej vlny respondujúcich génov.

#### **4. Ide len o "súboj" transkripčných faktorov ? - zd'aleka nie**

Pôvodný model Ashburnera a kol. (1974) predpokladal predovšetkým účasť transkripčných faktorov na propagácii pufových štádií po iniciácii ekdyzonom. Hoci logická presumpcia o ich účasti na aktivácii neskorých pufov či autoregulácii našla experimentálnu podporu, molekulárne štúdie veľmi zreteľne ukazujú, že syntéza a následná väzba transkripčného faktoru do promótoru niektorého génu je úplne nedostatočná k vysvetleniu tak zložitého programového procesu akým je sekvenčná aktivácia génov počas vývoja. Naviac, termín sekvenčná aktivácia génov ďaleko presnejšie vystihuje podstatu javu, prostredníctvom ktorého sa snažíme pochopiť a p o prvýkrát vysvetliť ako sú na molekulárnej úrovni riadené a uskutočňované komplexné vývojové pochody, než akým je sekvenčná aktivácia pufov, pretože v samotných slinných žľazách ekdyzon indukuje expresiu väčšieho počtu génov než ktoré môžeme detekovať podľa výskytu p ufov. *In situ* hybridizácie selektívne izolovaných skorých ekdyzon-inducibilných mRNA resp. cDNA k polyténnym chromozómom odhalili minimálne 16 primárne responzívnych lokusov, čiže o 11 viac než na koľko by sa dalo usudzovať z indukcie pufov (Farkaš, 1991). Okrem obligátne známych pufy tvoriacich lokusov sa hybridizačný signál vyskytoval väčšinou na nečakaných lokusoch kde sa nikdy pufy neobjavujú. Táto okolnosť automaticky zvyšuje počet priamych účastníkov vstupujúcich do hry hneď na začiatku procesu.

Hra o exekúciu vývojového programu má ale aj svojich nepriamych účastníkov, komparzistov. Vezmime si za príklad len gén *E74*. V absencii ekdyzonu sú jeho transkripty nedetekovateľné, ale stačí jeho  $10^{-8}$  M koncentrácia aby sa indukovala expresia aspoň na nízkej úrovni a pri  $10^{-6}$  M došlo k plnej indukcii (Karim a Thummel, 1992), z čoho p lynie, že ekdyzon je esenciálny pre aktiváciu transkripcie *E74*. Ponúka sa ale otázka či ekdyzon je suficientný k expresii *E74* génu? A odpoveď je prostá: nie! Doposiaľ jediná analýza promótorových sekvencií génu *E74* ukázala, že m inimálne 2 transkripčné faktory, Zeste a GAGA, sa viažu v niekoľkých samostatných a niekoľkých navzájom prekrývajúcich sa úsekoch asi +200 bp za transkripčným štartom (Thummel, 1989). Inými slovami, dávno pred príchodom ekdyzonu musia produkty génov *zeste* (*z*) aj *Trithorax-like* (*Trl*) t.j. GAGA, sedieť na promótoe *E74*, aby steroidný hormón mohol vstúpiť na javisko a začať dirigovať orchester niekoľkých stoviek "podriadených" génov. Chýbanie Zeste či GAGA faktoru by znamenalo, že dirigent bude bez rúk i partitúry a nezaznie ani jeden tón. Stačí už len pripomenúť, že *E74* promótor je

dost veľký aby na sebe "uniesol" viacerých než len 2 komparzistov, a že gén *E74* má hodne iných a dostatočne dlhých oblastí vnútri transkripčnej jednotky kam sa môžu viazať iní komparzisti, a že okrem *E74* sa jedná aj o *BR-C*, *E75* a možno ďalších aspoň 13 génov a že .... Teda zdá sa, že komparz nie je len komparz, ale každý jeden účastník môže hrať podstatnú úlohu v príprave celého systému a podľa jeho dôležitosti buď nezaznie žiaden tón alebo budú znieť tóny falošné.

Aby sme zostali ešte nejaký čas verní transkripčným faktorom, vrátime sa k našim "starým známym" nukleárnym receptorom. Vzájomná interakcia medzi Usp a EcR a ekdyzonom za tvorby funkčného komplexu ligand-receptor je očakávanou samozrejmosťou, ale ani tu nejestvuje priamočiary schématicizmus, ktorý by vyhovoval jednoduchým predstavám. Podobne ako jeho cicavčí homológ RXR, aj Usp je univerzálnym heterodimerizačným partnerom mnohých nukleárných receptorov. Jeho úloha ako partnera EcR v čase ekdyzonových pulzov sprevádzajúcich metamorfózu je nespochybniteľná, ale chýbajú experimentálne dôkazy o jeho heterodimerizácii s EcR počas larválno-larválnych zvliekaní tiež riadených pulzami ekdyzonu (Henrich a kol. 1994; Hall a Thummel, 1998) a mimo pulzov ekdyzonu. Usp má však minimálne dvoch ďalších dimerizačných partnerov: DHR38 a Svp (Sutherland a kol., 1995; Zelhof a kol., 1995a,b), s ktorými vstupuje do interakcie tkanivovo-špecificky, nakoľko oba menované nukleárne receptory nie sú exprimované ubikvitózne; táto interakcia sa môže stať ubikvitóznou pri ich ektopickej expresii riadenej z hsp70 promótoru. Za týchto podmienok DHR38 a najmä Svp inhibujú dimerizáciu Usp s EcR nielen preto, že sú v silnom nadbytku k Usp a k EcR, ale najmä preto že ich interakcia sa ukazuje byť silnejšia či preferovanejšia než medzi Usp a EcR. Hoci heterodimerizácia Usp a EcR v absencii ekdyzonu je možná a tento neligandovaný bipartitný komplex pôsobí skôr ako transkripčný represor než aktivátor (Dobens a kol., 1991), prítomnosť ligandu tento komplex silne stabilizuje (Yao a kol., 1992, 1993; Thomas a kol., 1993). Ligand-receptor je veľmi dynamický komplex, ktorého stabilita nadobúda dočasne termodynamickú rovnováhu na určitej úrovni v závislosti od dostupnosti jednotlivých komponentov. Preto ektopicky riadená nadmerná expresia DHR38 či Svp môže ľahko saturovať dimerizačné potreby Usp a sekvestrovať všetky jeho molekuly čím sa stane nedostatkovým pre dimerizáciu s fyziologickými hladinami EcR proteínu i v prítomnosti ligandu. Ak v určitom tkanive exprimujúcom za normálnych podmienok EcR a Usp dochádza aj k expresii Svp či DHR38 ešte pred pulzom ekdyzonu (napr. epiderma alebo očno-antenálny imaginálny disk), už i fyziologická hladina Svp alebo DHR38 môže vďaka silnejšej afinite k Usp sekvestrovať významný podiel jeho molekúl a tak regulovať či modulovať následnú ekdyzonovú signalizáciu a prispievať tak k jej tkanivovo- a temporálne-špecifickému charakteru. Ako sme už spomenuli vyššie, Usp proteín pochádza z veľmi jednoduchého *usp* lokusu, ktorý je takmer konštitutívne exprimovaný zabezpečujúc tak kontinuálnu prítomnosť produktu. Usp sa tak stáva voľne či všeobecne dostupným partnerom čakajúcim "na rohu" na príležitosť "párovať" sa nielen s EcR, ale aj s DHR38 a Svp, a zrejme jeho dimerizačný arzenál tým nie je zďaleka vyčerpaný.

Ďalším faktorom, ktorý môže aritmeticky zvýšiť počet kombinácií akými sa bude proces potenciálne uberať sú izoformy jednotlivých proteínov. U EcR poznáme 3 izoformy pričom EcR-B1 je v čase metamorfózy dominantnou v obsolentných larválnych tkanivách a EcR-B1-A dominuje v imaginálnych diskoch, z ktorých sa bude formovať nový dospelý jedinec (Talbot a kol., 1993). Prítomnosť však v oboch typoch tkanív sa nachádza aj recesívne množstvo opačnej izoformy alebo dokonca izoformy EcR-B2, o úlohe ktorej sa dodnes vedú diskusie. Nakoľko DNA-afinita aj ligand-viažúca doména sú u všetkých 3 izoformách identické, prvé zhodnotenie tejto skutočnosti viedlo k domnienke, že afinita k ligandu ako aj spektrum cieľových génov sú u nich rovnaké a divergenciu v odozve zabezpečuje odlišná transaktivačná doména, ktorá zrejme zodpovedá za rekrútovanie iných interakčných partnerov na enhanceroch resp. v oblasti promótoru (Koelle a kol., 1991; Talbot a kol., 1993). Či je tento záver správny musia overiť až experimenty, ale už dnes na základe štúdií cicavčích heterodimerizačných receptorov vieme, že N-terminálna časť nesúca túto transaktivačnú doménu môže do určitej miery ovplyvňovať tiež intenzitu dimerizácie a následne afinitu k ligandu (Forman a kol., 1996; Le Douarin a kol., 1997; Moras a Gronemeyer, 1998; Mark a kol. 1999; Egea a kol., 2000), čo utvára potenciálnu príležitosť pre zmenu smerovania odozvy už v jej prvých fázach (viď kap. 5 a 6).

Ale treba upozorniť, že izoformy sa nemusia uplatňovať iba v primárnom kroku a že ich výskyt či funkcia nemusí vždy poskytovať jednoznačné vysvetlenie ako je tomu u EcR. Príkladom je skorý ekdyzonom regulovaný *BR-C* lokus, ktorého funkcia je esenciálna nielen pre indukciu celého procesu ale aj jeho propagáciu v neskorších fázach. Emery a kol. (1994) zistili, že expresia jednotlivých *BR-C*

izoforiem má viacmenej tkanivovo-špecifický charakter pričom dominantnou ak nie jedinou v slinných žľazách zistenou izoformou je BR -C Z1. Analýza genetickej funkcie jednotlivých izoforiem u transgénnych jedincov priniesla poznatok o čiastočnej redundancii medzi BR -C Z1 a BR-C Z4 izoformami a postupnom prekryvaní sa úlohy BR-C Z2 izoformy BR-C Z1 izoformou pri morfogéneze imaginálnych diskov (Bayer a kol., 1996, 1997; Crossgrove a kol., 1996). Už tieto skutočnosti ukazujú, že BR -C môže mať multiplikované úlohy pri kontrole s vývojovými procesmi spriahnutej expresii génov. Séria experimentov s ektopickou expresiou jednotlivých izoforiem odhalila, že v samotných slinných žľazách jedna izoforma je schopná kontrolovať expresiu jednej či dvoch ďalších BR -C izoforiem a to predovšetkým v závislosti od vývojového štádia, v ktorom bola ektopická expresia aplikovaná (Kuchárová a Farkaš, nepublikované). To poukazuje na skutočnosť, že s postupujúcimi vývojovými krokmi sa mení schopnosť jednotlivých BR-C promótorov respondovať na príslušné izoformy BR-C proteínov čo môže znamenať účasť ďalších zatiaľ neznámych faktorov na regulácii BR-C lokusu, ktoré by mohli účinkovať v kooperácii s BR -C izoformami. Tým sa potenciálny výsledok autoregulácie bude meniť v závislosti od prítomnosti týchto nových faktorov. Úlohou BR-C lokusu pochopiteľne nie je regulovať len samého seba, ale predovšetkým desiatky ak nie stovky cieľových génov, na čo sa dá usudzovať z prítomnosti BR -C proteínu na početných bezpufových i pufy tvoriacich lokusoch polyténnych chromozómov (Emery a kol., 1994). Keďže práca Hodgettsa a kol. (1995) dokázala, že každá izoforma BR -C sa preferenčne viaže k iným cieľovým génom, citlivo autoregulovaná transkripcia BR-C v jednom type buniek musí logicky prispievať ku kaskádovito narastajúcim rozdielom vo vývojovo špecifickej expresii postupne aktivovaných génov medzi odlišnými tkanivami. Že tento mechanizmus je viac než pravdepodobný i počas pufových cyklov na polyténnych chromozómoch dokazuje nedávny nález všetkých 4 izoforiem BR-C v larválnych slinných žľazách divého typu (Kuchárová a Farkaš, nepublikované). Výsledky Hodgettsa a kol. (1995) tiež poukázali na skutočnosť, že niektoré dvojice izoforiem BR -C majú k obmedzenému počtu sekvencií podobnú väzobnú afinitu, čo nutne vedie ku konkurenčnému boju o väzbu na takýto enhancer. Súboj ľahko rozhodne početná prevaha jednej z izoforiem a súčasne tak "prinúti" porazenú izoformu aby sa viazala na iný možno afinitne menej prítiažlivý enhancer, ktorý na druhej strane môže patriť génu s esenciálnou funkciou pre ďalší vývojový krok daného tkaniva. V tomto prípade i menej môže byť viac a prehratý súboj dáva šancu tej správnej ceste. Tento mechanizmus určite nie je vzácnou výnimkou. Antagonizmus medzi dvoma nukleárnymi receptormi (FTZ-F1 $\beta$  a DHR39) prispieva k transkripcii závislej na už spomínanom FIRE -enhancery klonovanom pred reportérový gén pri kotransfekčných analýzách v stabilizovaných bunkových líniiach (Ohno a kol., 1994). Teda aj tu, spoločný cieľový gén môže byť koregulovaný na transkripcijnej úrovni kompetíciou medzi FRZ-F1 a DHR39 monomérmi o väzbu na spoločný responzívny element.

Iným mechanizmom, ktorý sa dá uplatniť počas celého obdobia pôsobenia ekdyzonu, t.j. všetkých 21 pufových štádií, je aktívna účasť tzv. koregulátorov nukleárných receptorov, ktoré boli najprv objavené u cicavcov (Nagy a kol., 1997). Jedným z týchto koregulátorov je tzv. SMRTER (silencing mediator of retinoid acid and thyroid hormone receptor) zabezpečujúci represiu EcR interakciou s represorom Sin3A, známym tvorbou komplexu s histónovou deacetylázou Rpd3/HDAC (Tsai a kol., 1999). O esenciálnosti génu *smrter* nás utvrdzuje mutácia *EcR*, ktorá je neschopná vchádzať do interakcie so SMRTER proteínom a spôsobuje niekoľko vývojových defektov sprevádzaných letalitou. Druhým dnes známym koregulátorom je *alien*, kódujúci putatívny translačný faktor Alien nachádzajúci sa v cytoplazme a interagujúci s neligandovaným EcR a tiež so Svp (Goubeaud a kol., 1996; Dressel a kol., 1999). Alien nevykazuje významnú interakciu s USP, DHR3, DHR38, DHR78, či DHR96. Je zaujímavé, že Alien má schopnosť inhibovať tiež ľudský tyroidný receptor zhodne s jeho ľudským homológom. Pridanie ligandu, ekdyzonu či tyroxínu, uvoľňuje túto represiu a umožňuje aktiváciu transkripcie. Pretože SMRTER aj Alien homológy u cicavcov majú tendenciu fungovať s viacerými nukleárnymi receptormi, nemôžeme vylúčiť, že mušie homológy interagujú okrem EcR a Svp aj s ďalšími nomenovanými členmi tejto rodiny v procese sekvenčnej aktivácie génov.

Už bolo spomenuté, že bezintrónový 4 kb gén odlišuje *usp* od väčšiny ekdyzonom priamo regulovaných génov, ktoré sú komplexné a zaberajú aspoň 50 kb genom ickkej DNA čo indikuje možnosť ich zložitej multifaktoriálnej regulácie a ďaleko presnejšej temporálnej kontroly. Táto presná temporálna kontrola spočíva vo využívaní evolučne silne konzervovaného mechanizmu transkripcie eukaryotických génov, na čo na príklade génu *E74* upozornil Thummel (1992). Rýchlosť transkripcie

je konštantná pri 1 kb/min t.j. krátke gény ako je *usp* budú transkribované do pre-mRNA behom 4-5 min, kým dlhé gény ako je napr. *E74* majúci 60 kb budú prepísané až za 1 hod. Hoci efektívnosť smerujúca k čo najrýchlejšiemu vytvoreniu funkčnej mRNA je podporená zostrihom už počas transkripcie (LeMaire a Thummel, 1990), dĺžka a počet intrónov v transkripčnej jednotke sú rozhodujúcim prvkom určujúcim čas vzniku maturovanej mRNA a ňou kódovaného proteínu. Preto stupeň i efektívnosť temporálnej kontroly expzie vývojovo esenciálnych génov si v evolúcii vyžadovala zmeny v počte a dĺžke intrónov čo súčasne umožňovalo i včleňovanie dôležitých kontrolných elementov ako sú enhancery a silencers. Simultánna aktivácia primárne-responzívnych génov jediným induktorom potom vyústi do časovo koordinovanej transkripcie väčšieho počtu lokusov dispergovaných po celom genóme.

Aby sme si mohli lepšie predstaviť komplexnosť odozvy na steroidný hormón vrátíme sa ešte raz späť ku kapitole 3. kde sme uviedli, že produkty neskorého pufu 63E asociovaného s génom *L63* majú charakter CDK proteín kináz (Sauer a kol., 1996), ktoré v polyténnych slinných žľazách neplnia funkciu v kontrole bunkového cyklu, ale zrejme fosforylujú proteíny zúčastnené na sekvenčnej aktivácii génov. To dáva príležitosť prepojiť hierarchickú kaskádu tvorenú niektorými zo skorých ekdyzon-inducibilných transkripčných faktorov s inými signálnymi dráhami, o ktorých sa dodnes u slinných žliaz predeterminovaných k histolýze zatiaľ vôbec neuvažovalo a ponecháva otvorených mnoho perspektívnych možností pre výskum. Je nepochybné, že posttranslačné modifikácie transkripčných faktorov či nimi indukovaných efektorových proteínov ako je fosforylácia, acetylácia, glykozylácia, prenilyácia, myristoylácia a pod. budú neoddeliteľnou súčasťou tohto procesu. Inou a nemenej zaujímavou perspektívou je aj recentne opísaná aktivácia EcR chaperónmi typu tepelné-šokových proteínov (Hsc70 a Hsp83), ktorých účasť na kontrole aktivity nukleárných receptorov bola doposiaľ známa len u homodimerizujúcich steroidných receptorov stavovcov typu glukokortikoidného, estrogénového a progesterónového receptora (Arbeitman a Hogness, 2000). Cieľom pôsobenia Hsc70 a Hsp83 je len EcR a nie Usp, a okrem týchto dvoch chaperónov účasť 4 ďalších auxiliárných proteínov je nevyhnutná na zmenu inaktívneho EcR do stavu aktivovaného EcR schopného viazať sa na DNA a to bez ohľadu na prítomnosť ligandu. Táto okolnosť i odlišnosť auxiliárných proteínov znamenajú, že chaperónový komplex potrebný k aktivácii EcR je novým a distinktným mechanizmom signálnej dráhy ekdyzonu.

## **5. Ako to celé vlastne začína: responzívne elementy a enhancery**

Jednou z najväčších predností opisovaného systému je jeho selektívna inducibilita jediným faktorom, ktorým je steroidný hormón ekdyzon. V našom laboratóriu sme testovali viaceré cicavčie steroidy a žiaden nebol schopný vyvolať špecifickú odozvu. Keď larvy dosiahnu koniec 3. instaru a sú pripravené pre metamorfózu "zostanú čakať" na povel prichádzajúci v podobe prudkého zvýšenia endogénnej hladiny ekdyzonu, ktoré nazývame pulzom. Fáza "čakania" je však u divého typu takmer nepozorovateľná, pretože prichádza spontánne ako následok predošlých postupných vývojových a metabolických zmien organizme. U kondicionálne letálnych homozygotných mutácií *lethal(3)ecdysoneless<sup>ts1</sup>* (*ecd<sup>l</sup>*) a *suppressor of forked<sup>ts67g</sup>* (*su(f<sup>ts67g</sup>)*) je ale možné prenesením do restriktívnej teploty dosiahnuť deficienciu na ekdyzon a zastaviť vývoj práve na konci 3. larválneho instaru, ktorý tak môže trvať namiesto 48 hod až 2 týždne (Garen a kol., 1977; Snyder a Smith 1976; Klose a kol., 1980; Hansson a Lambertson, 1983). Injekcia ekdyzonu do takýchto lariev je postačujúca na vyvolanie metamorfózy. Z vyššie u vedeného vyplýva, že signál v podobe ekdyzonu sa prenáša do jadra prostredníctvom komplexu hormón-EcR/USP kde kontroluje transkripciu konkrétnych génov. Čo rozhoduje, ktoré gény budú ekdyzonom regulované a o tom či budú regulované pozitívne alebo negatívne, či dokonca o tom do akej miery či akou intenzitou? Stačí na to jeden mechanizmus, či ide o hru viacerých účastníkov? Na prvú otázku čiastočne odpovedal nález krátkej asi 15 bp sekvencie DNA v promotore jedného zo 7 majoritných "heat shock" proteínových génov, *hsp27* (Riddihough a Pelham, 1987), nazvanej ekdyzon-responzívny element (EcRE). Tento *hsp27*-EcRE resp. jeho tandem 3-5 repetícií patrí dodnes k najsilnejším a najinducibilnejším známym enhancerom (No a kol., 1996; Sawicki a kol., 1998). V tom istom období na inom pracovisku prebiehala paralelne charakterizácia *Eip28/29* a *Eip40* génov kódujúcich ekdyzon-inducibilné proteíny EIP28/29 a EIP40 zo stabilizovanej embryonálnej bunkovej línie Kc (Savakis a kol., 1980, 1984; Cherbas a kol., 1986). Súčasťou ich analýzy bola aj veľmi podrobná identifikácia potenciálnych EcRE

v sekvenciách ohraničujúcich *Eip28/29* gén. Jej výsledky, založené nielen na porovnaní homológií sekvencií či väzby proteínov z jadrových extraktov k dvojvláknovému oligonukleotidu (EMSA), ale najmä na transfekcii konštruktov obsahujúcich rôzne úseky *Eip28/29* génu do Kc buniek však priniesli viacero prekvapení (Cherbas a kol., 1991). Gén *Eip28/29* obsahuje aspoň 3 EcRE rozložené po celej transkripčnej jednotke, pričom len jeden sa nachádza v promótorovej oblasti -440 bp od transkripčného štartu - ten je ale na ekdyzon insenzitívny. Naopak, 2 EcRE, proximálny a distálny, nachádzajúce 521 a 2295 bp za polyadenylačným signálom sú potrebné k ekdyzonovej indukcii génu *Eip28/29*. Každý EcRE obsahuje imperfektný palindróm s konsenzus sekvenciou 5' - RG(GT)TCANTGA(CA)CY-3'. Prítomnosť plne funkčného EcRE pred reportérovým génom v kotransfekčnom systéme vedie v absencii hormónu k represii aj bazálnej transkripcie, kým prídanie ekdyzonu vyvolá mnohonásobnú indukciu. Podobne, aj u génov *E74* a *E75* sa potenciálne EcRE nachádzajú vo vnútri transkripčnej jednotky (Burtis a kol., 1990; Segraves a Hogness, 1990) a porovnanie týchto elementov s EcRE z iných postupne klonovaných ekdyzon-responzívnych génov stále naliehavejšie ukazuje, že na rozdiel od doposiaľ definovaných hormón-responzívnych elementov u cicavcov, EcRE u *Drosophila* môže byť nielen tzv. DR (direct repeat) ale aj ER (everted repeat) sekvencia bez jednoznačných pravidiel. I napriek tomu, väčšina z nich funguje ako účinné elementy pre väzbu komplexu EcR/Usp. Aký môže mať ale význam taká pleiotropia ekdyzon-responzívnych elementov? Odpoveď na túto otázku je pravdepodobne v druhej a tretej otázke, ktorú sme si položili na začiatku tejto kapitoly.

Drvivá väčšina experimentov s väzbou EcR/Usp komplexu na EcRE sa uskutočňovala v *in vitro* podmienkach alebo v transfekovaných bunkových líniiach a dodnes nám chýbajú funkčné *in vivo* štúdie založené na využití transgénnych reportérových systémov ako je bakteriálna  $\beta$ -galaktozidáza či GFP (zelený fluorescenčný proteín) so sériou viacerých EcRE sekvencií. No napriek tomu, analýza expresie širšej skupiny ekdyzonom regulovaných génov počas vývoja alebo pri kultivácii larválnych orgánov v médiu nám poskytuje veľmi indikatívny náhľad na tento problém. Medzi gény najcitlivejšie reagujúce na ekdyzon už pri  $10^{-10}$  až  $10^{-9}$  M koncentrácii patria *E74*, *BR-C*, *Sgs-3*, *Sgs-4*, *FTZ-F1 $\beta$*  pričom ide o pozitívnu odpoveď, čiže o indukciu s výnimkou *FTZ-F1 $\beta$* , ktorého ekdyzon reprimuje (Karim a Thummel, 1991; Andres a kol., 1993; Woodard a kol., 1994). Avšak gény ako *BR-C*, *Sgs-3* alebo *Sgs-4* reagujú na ekdyzon duálne: uvedené nízke koncentrácie ich aktivujú, ale vyššie koncentrácie ekdyzonu ( $10^{-7}$  až  $10^{-6}$  M) vedú k represii ich transkripcie čo je najlepšie dokumentované prechodom zo štádia PS1 do PS2. Gén *FTZ-F1 $\beta$*  je zase aktívny počas PS13/14 pri nulových koncentráciách hormónu. Naopak, gény ako napr. *E75*, *DHR3* či *DH39* reagujú len inducibilne ale až na vysoké koncentrácie ekdyzonu t.j.  $10^{-7}$  až  $10^{-6}$  M a pri nižších koncentráciách sú necitlivé. Porovnaním a kompilovaním potenciálnych responzívnych sekvencií uvedených génov (Burtis a kol., 1990; Segraves a Hogness, 1990; DiBello a kol., 1991; Lavorgna a kol., 1991; Antoniewski a kol., 1994, 1995, 1996; Horner a kol., 1995; Niedziela-Majka a kol., 2000) vyšlo najavo, že tieto rozdiely v citlivosti génov na koncentráciu ligandu sú dané predovšetkým typom a umiestnením EcRE v rámci transkripčnej jednotky. Nesporne typ EcRE s naviazaným EcR/Usp komplexom v kooperácii s ďalšími transkripčnými faktormi a kofaktormi v oblasti promótoru i hlboko v transkripčnej jednotke daného génu vyvolajú konečný efekt (Lehman a Korge, 1995, 1996; Lehman, 1996; Lehman a kol., 1997). Základnou úlohou takéhoto typu responzívnych elementov teda je zvýšiť počet úspešných iniciácií transkripcie a zabezpečiť efektívnu elongáciu transkriptu v súlade s akútnymi ale tranzitnými potrebami bunky na jeho produkt.

## 6. Ligand či ligandy ?

Toto by mala byť relatívne krátka kapitola, pretože v modelovom systéme poznáme s určitou len jeden ligand a to ekdyzon, presnejšie povedané 20-hydroxyekdyzon (20HE), ktorý je považovaný za biologicky aktívny hormón a dokonca "funguje" aj *in vitro*. Ak na chvíľku zabudneme na genetiku a molekulárnu biológiu, tak podrobná analýza dodnes získaných údajov o chémii a fyziológii ekdysteroidov (generický názov pre všetky steroidné často polyhydroxylované látky vykazujúce biologickú aktivitu ekdyzonu) nám nedovolí ignorovať nižšie uvedené fakty a už vôbec nie zanedbať ich následky. Proste *Drosophila* nepozostáva len z génov a ich produktov, ale okrem vody ju tvoria aj tisíce iných organických látok, z ktorých každá plní svoj význam i vo vývoji.

Za využitia "rádioimmunoassay" metódy (RIA) a niekedy i v kombinácii s vysoko tlakovou kvapalinovou chromatografiou (HPLC) či dokonca hmotovou spektrometriou (MS či GC-MS) sa nielen stanovil priebeh titru hormónu ekdyzonu počas vývoja *Drosophila*, ale určila sa aj prítomnosť ďalších ekdysteroidov (Borst a kol., 1974; DeReggi a kol., 1975; Hodgetts a kol., 1977; Berreur a kol., 1979, 1984; Belinski-Deutsch a kol., 1983; Smith a Bownes, 1985; Sommé-Martin a kol., 1988). Okrem logicky očakávaného ekdyzonu, ktorý je prekursorom 20HE, sa zistili 20,26-dihydroxyekdyzon, 2-deoxy-20-hydroxyekdyzon a 3-dehydroekdysteroidy. Naviac Redfern (1984) u lariev *Drosophila* detekoval makisteron. Jednoduchá kombinácia RIA a HPLC dokázala, že posledných asi 18 - 20 hod 3. larválneho instaru má nesmierne zaujímavý výskyt 2 dominantných ekdysteroidov. Asi u 80-85 hod larvy sa ako prvý v cirkulácii zisťuje len ekdyzon o veľmi nízkej koncentrácii na hranici detekovateľnosti tejto citlivej metódy. Asi o 6 - 10 hod neskôr je v cirkulácii prítomný už aj 20HE, ale je v slabom pomere k dominujúcemu ekdyzonu; toto je obdobie, ktoré z predošlého textu poznáme ako pufovú štádiu PS1. V priebehu ďalších asi 8 - 10 hod sa tento pomer jednoznačne ešte stále pri veľmi nízkej celkovej hladine ekdysteroidov - zmení v prospech 20HE; zatiaľ pretrvávajú štádiu PS1. Náhle však dôjde k pulzu vysokého titru 20HE, ktorým sa larva dostáva do PS2 a spúšťa sa metamorfóza. Už v kapitole 4. bolo uvedené, že participácia EcR/Usp komplexu na ekdyzonovej signalizácii počas larválnych zvliekaní či v polovici 3. instaru nebola doposiaľ potvrdená, hoci ani vylúčená. Tu sa naskýta príležitosť uvažovať o úlohe rôznych ligandov, metabolitov ekdyzonu, a rôznych kombinácií nukleárných receptorov, ktoré môžu zabezpečovať aktiváciu signálnej dráhy. Je nesporné, že rôzne ligandy budú mať k jednému receptoru odlišnú afinitu, a naopak varieta receptorov bude vykazovať rozdielnu selektivitu k ligandom. V takomto systéme sa postupne majú šancu uplatniť viaceré kombinácie ligandov a receptorov vedúc tak organizmus larvy od prípravných fáz až po spustenie metamorfózy. Reálny základ tejto predstave v súčasnosti poskytol Wang a kol. (2000), ktorí demonštrovali, že každý zo série ekdysteroidov (ekdyzon, 20HE, 2-deoxy-20-hydroxyekdyzon, ponasteron A, polypodin B, muristeron) má iný účinok na tvorbu či stabilitu komplexu EcR/Usp a potom na jeho väzbu k *hsp27*-EcRE. Táto štúdia s využitím výmeny homologických úsekov medzi EcR a Usp dvoch odlišných druhov, *Drosophila* a komára *Aedes*, presvedčivo dokázala, že selektivita na ligand v EcR/Usp komplexe plne prislúcha iba EcR komponentu a Usp pôsobí "iba" ako stabilizačný prvok komplexu. Za diferenciálnu odozvu na hormón zodpovedajú helixy 9 a 10 v C-terminálnej oblasti ligand-viažúcej domény EcR a Tyr611 má kritickú úlohu vo väzbe tohto ligandu.

Počas metamorfózy, či už v jej iníciačných fázach, ktoré môžeme sledovať v podobe 21 pufových štádií na polyténnych chromozómoch, alebo v pokročilejších fázach kedy dochádza k vytvoreniu nového jedinca (imága) z diploidných primordií nazývaných imaginálne disky, dochádza k postupnej expresii viacerých členov superfamílie nukleárných receptorov, ku ktorým zatiaľ nepoznáme ligandy. Pulz ekdyzonu má ozaj charakteristiku krátko trvajúceho zvýšenia hladiny 20HE čo sa dosahuje nielen jeho dočasnou prudkou syntézou a sekréciou ale najmä katabolizmom. Preto sa nedá sa vylúčiť, že niektoré z metabolitov ekdyzonu resp. 20HE sú hľadanými ligandami pre orfantné receptory exprimované v rôznych fázach metamorfózy ako následok primárnej indukcie skorých génov. Dokonca by sme mohli predpokladať, že špeciálna skupina steroidných či nesteroidných ligandov môže byť syntetizovaná výlučne ako následok primárnej aktivácie skorých génov, ktoré si budú vyžadovať prítomnosť špeciálnych receptorov. Tieto orfantné receptory okrem ich úlohy transkripčných faktorov regulujúcich expresiu cieľových génov, sa môžu podieľať na samotnom katabolizme či konverzii vznikajúcich "ligandov". Ako si predstaviť participáciu transkripčných faktorov z rodiny nukleárných receptorov na tak relatívne bezvýznamnej činnosti ako je odbúravanie malého ligandu či tvorba odpadných produktov? Z aspektu dnešných poznatkov by mohli existovať aspoň dve potenciálne cesty ako by sa nukleárne receptory mohli podieľať na intermediárnom metabolizme. Prvou a najjednoduchšou predstavou je, že gény kódujúce enzýmy intermediárneho metabolizmu sú cieľom pôsobenia nukleárných receptorov. Jedným z ekdyzon-inducibilných pufových génov izolovaných metódou subtraktívnej hybridizácie (Farkaš, 1991; Hurban a Thummel, 1993) je aj jedna z početných mikrozomálnych cytochróm-P450 oxidáz, ktoré sa podieľajú na metabolizme steroidov. Iným príkladom, hoci priamo nesúvisiacim s metabolizmom ligandov, sú nedávno nami klonované gény malát dehydrogenáz (MDH) koordinovane regulované ekdyzonom a juvenilným hormónom (Daniš a Farkaš, nepublikované); MDH sú typickými enzýmami bazálneho metabolizmu a ich hormonálna kontrola súvisí s metamorfózou (Farkaš a Knopp, 1997, 1998) indikuje, že ani také procesy ako je tvorba energetických zásob či dostatku NADPH nie sú ponechané počas ontogenézy



náhode. Druhá cesta ako si predstaviť účasť receptorov na prípadnom metabolizme steroidov je síce len teoretická, ale pravdepodobná a navyiac potenciálne negenomická. Minimálne dva z doteraz známych orfantných nukleárných receptorov *Drosophila*, *E75* a *E78*, kódujú po jednej izoforme bez DNA-viažúcej domény (Segraves a Hogness, 1990; Stone a Thummel, 1993). Ligand-viažúce domény týchto alterovaných receptorov sú pritom nezmenené a preto si mohli uchovať schopnosť väzby ligandu. Keďže strata schopnosti viazať sa k DNA ich vylučuje z priamej účasti na regulácii expresie génov, je veľmi pravdepodobné, že tieto alterované receptory môžu slúžiť ako špecializované senzory pre metabolizáciu ligandov už "použitých" na aktiváciu genomicky pôsobiacich nukleárných receptorov.

Keď uvedené skutočnosti zväžeme v kontexte diferenciálnej expresie génov v rôznych tkanivách a časových intervaloch, v tomto prípade najmä so zreteľom na nukleárne receptory, otvára sa nám ďalšia stránka regulácie vývojového procesu za účasti nemalého počtu receptorov a ich potenciálnych ligandov, ktorých kombinácie môžu mať častokrát tkanivovo-špecifický význam.

## **7. Aký to má celý význam ? - od génu k fyziológii bunky a funkcii tkaniva**

Verbálne spojenie fenoménov "tkanivovo-špecifické" alebo "časovo-špecifické" je zatiaľ často používaným technickým termínom opisujúcim javy súvisiace s expresiou určitých génov, pre ktoré zatiaľ nemáme ešte lepšiu definíciu - nepochybne pre nedostatok informácií. Na pozadí analyzovaných dejov je potrebné vidieť potenciálne súvislosti medzi zdanlivo samostatnými procesmi. Tkanivovo-špecifické diferencie v expresii génov musia v konečnom dôsledku v rámci jedného organizmu viesť k orchestrálnej súhre všetkých orgánov, predovšetkým ak ide o tak zložitý a rýchly komplex pochodov akým je metamorfóza.

Jednoduchý pohľad na izolované tkanivo, napr. slinné žľazy ktoré sú ideálnym modelom po mnohých stránkach, však nemusí poskytnúť dobrý príklad pre vysvetlenie komplexnosti v koordinácii ontogenézy medzi orgánmi v rámci celého organizmu. Dodnes poznáme spoľahlivo len jednu funkciu larválnych slinných žliaz, a tou je už spomínaná syntéza Sgs proteínov a z nich pozostávajúceho sekretu (Fraenkel a Brookes, 1953). Asi 22 hod po ukončení syntézy Sgs proteínov t.j. približne 12-14 hod po vylúčení gleja a puparizácii slinné žľazy degenerujú a sú odstránené. Na tieto dva úkony slinná žľaza potrebuje 193 opticky viditeľných pufov, niekoľko stoviek ak nie tisíc temporálne aktivovaných génov, nehovoriac o spotrebovanej energii ! Aký to dáva celý zmysel ? Histolýza slinných žliaz je nevyhnutná nielen preto, že si splnili svoju funkciu, ale aj preto, aby spolu s ostatnými už použitými larválnymi tkanivami "neprekážali" evaginujúcim a proliferujúcim imaginálnym diskom, ktoré na podnet ekdyzonu veľmi rýchlo -priamo ochotne- vyplňajú uvoľnený priestor po degradovaných larválnych orgánoch. Na rozdiel od terminálne diferencovaných a často polyténnych či polyploidných larválnych tkanív, ktoré nereagujú na intercelulárne signály bunkovými cyklami, diploidné imaginálne disky a histoblasty sú k takýmto signálom veľmi citlivé. Kontaktný signál má u predeterminovaných diploidných buniek rovnocenný význam ako signály humorálne a preto pri dotyku s neeliminovaným larválnym orgánom sa môže aspoň dočasne pozastaviť ich morfogenéza a tým stratiť synchronnosť s ostatnými imaginálnymi diskami. Takéto malé "meškanie" má šancu zapríčiniť zmenu veľkosti či polohy orgánu alebo orgánovej sústavy.

Popri tomto stoickom aspekte je ale jasné že medzi niektorými génmi a funkciami je možné najst' priamy vzťah, napr. ektopická expresia *E63* navodí sekréciu granúl obsahujúcich Sgs proteíny aj bez ekdyzonu. Taktiež ektopická expresia *ftz-F1β* stačí k získaniu kompetencie na prechod z larválneho do prepupálneho cyklu puffingu. Rôzne mutácie génu *EcR* vedú k inhibícii tvorby pufov už v počiatočných štádiách. Ale "účinok" väčšiny ostatných individuálnych génov nie je možné priamo spojiť s určitým fenotypom, pretože hrajú "koncert" vo veľkom orchestri kde až súhra všetkých hráčov po dlhšom čase prinesie viditeľnú zmenu. Z nich najmarkantnejšou určite je histolýza slinných žliaz, ktorá sa udeje procesom geneticky riadenej PCD, ktorá má viac prvkov nekrózy než chronicky známej apoptózy. V rámci sekvenčnej aktivácie génov sú na jej konci zaradené skupiny lokusov kódujúce niekoľko regulátorov a exekútorov PCD. *Drosophila*, na rozdiel od mnohých zatiaľ skúmaných modelových organizmov má trojicu unikátnych induktorov PCD nazývaných *reaper (rpr)*, *head involution defective (hid)* a *grim* pochádzajúcich z lokusu 75CD a uplatňujúcich sa pri apoptóze najmä počas embryogenézy. Ich spoločnou črtou je prítomnosť tzv. "death" domény homologickej k Fas receptorom stavovcov. Rpr, Hid aj Grim fungujú ako priame aktivátory kľúčových kaspáz čím

spúšťajú kaskádu reakcií vyúsťujúcich do rozsiahlej proteolýzy bunkových komponentov. V čase prepupálneho cyklu puffingu vyvolaného druhým pulzom ekdyzonu sú exprimované aj *rpr*, *hid* a *grim* (Jiang a kol., 1997; Farkaš a Mechler, 2000), avšak ich aktivačnému účinku sa dá predísť ektopickou expresiou bakulovírusového antiapoptotického proteínu p35 (Farkaš a Mechler, 2000). Súčasťou PCD procesu v slinných žľazách či iných larválnych orgánoch je aktivácia *E93*, ktorá si vyžaduje expresiu *ftz-F1β* (Jiang a kol., 1997) ukazujúc tak na nutnosť sekvencií jednotlivých krokov či celých etáp pred dosiahnutím štádia vhodného k histolýze. Do koordinácie tohto procesu sa zrejme priamo zapája ekdyzon prostredníctvom EcR/Usp komplexu, ktorého potenciálny responzívny element sa našiel v promotóre *rpr* génu (Jiang a kol., 2000). No napriek tomu u transgénnych jedincov nesúcich 6 kópií divkej formy tumorsupresorového génu *lethal(2)giant larvae (l(2)gl)* je proces PCD mnohonásobne akcelerovaný vynechávajúci celý prepupálny cyklus pufov a dosahujúci úplnú histolýzu slinných žliaz do 2 - 3 hod po puparizácii s enormne potencovanou vakuolizáciou buniek (Farkaš a Mechler, 2000). Zaujímavá bola skutočnosť, že u čerstvo puparizovaných transgénov *l(2)gl<sup>fox</sup>* úplne chýbal normálny pre dané obdobie (PS10) charakteristický puffing, ale na 2. chromozóme sa vyskytoval výrazný puff 52A typický až pre PS19 -20 (Farkaš a Mechler, 2000). Jeho nedávne klonovanie odhalilo regulačnú subjednotku D vakuolárnej ATPázy zodpovednej za prudkú acidifikáciu cytoplazmy, ktorá nastáva u väčšiny tkanív pri PCD (Kuchárová a Farkaš, nepublikované). V promotóre *vATPase-D* sme našli tiež potenciálny EcRE tentokrát vykazujúci sekvenčnú homológiu k niektorým už dobre definovaným EcRE. Asi najpozoruhodnejším prekvapením bolo, že *l(2)gl<sup>fox</sup>* transgénne zvieratá nevykazujú žiadnu deviáciu vo vývoji či už u lariev, kukiel alebo imág, dokonca u nich nie je zvýšená PCD v embryonálnych tkanivách či imaginálnych diskoch - ubikvitózne prítomná dávka génu postihuje výlučne len obsolétne larválne tkanivá, p redovšetký m slinné žľazy. Otázkou však je, ako cytoskeletálny tumor supresorový proteín p127 kódovaný *l(2)gl* môže pri zvýšenej dávke svojho génu preskočiť polovicu vývojového programu a dospieť k tkanivovo -špecifickému koncu bez celej overtúry minimálne stovky lokusov? Tu sa p o prvý krát vynorila pochybnosť či celý druhý t.j. prepupálny cyklus pufov v slinných žľazách spojený s druhým pulzom ekdyzonu je vôbec potrebný aby sa dospelo k PCD? Prematurálna aktivácia expresie *rpr*, *hid* a *grim* génov u *l(2)gl<sup>fox</sup>* transgénov naznačuje, že všetky komponenty pre histolýzu žliaz musia byť prítomné už počas puparizácie, t.j. okolo PS10 (Farkaš a Mechler, 2000). Čo potom predstavuje zvyšných 11 pufových štádií a zložitý mechanizmus získavania kompetencie pre prepupálnu odozvu za interakcie niekoľkých orfantných nukleárných receptorov, ktoré nesporne regulujú rad cieľových génov? Jedným z potenciálnych vysvetlení je, že prepupálny cyklus pufov je pre samotné slinné žľazy v skutočnosti zbytočný a odráža skôr to čo sa "deje" v prud ko diferencujúcich a proliferujúcich tkanivách imaginálnych diskov a histoblastov, a nakoľko slinné žľazy sú už v tom čase predeterminované k histolýze, bol by to pre ne energeticky príliš náročný luxus aby daný sekvenčný proces reprimovali.

Tento prehľad ukazuje, že hoci začíname rozumieť počiatočným fázam a niektorým vymedzeným úsekom z celého procesu sekvenčnej aktivácie génov, stojí pred nami ešte dlhá cesta vyžadujúca charakterizáciu kompletnej zostavy génov nielen tvoriacich pufo ale aj tých, ktoré netvoria protuberancie euchromatínových úsekov, ale najmä interakcií a funkcií efektorových proteínov vykonávajúcich mravenčiu p rácu na konci celej kaskádovej hierarchie signálov. Výsledky z posledných rokov vnášajú viac svetla do priebehu realizácie vývojového programu, v ktorom sa prelínajú viaceré signálne dráhy a často, bez ohľadu na ubikvitózny charakter expresie, ovplyvňujú výsledný efekt tkanivovo-špecificky ale v prospech organizmu ako celku.

## Literatúra

- Andres A.J. a Thummel C.S. (1995) The *Drosophila* 63F early puff contain *E63-1*, an ecdysone-inducible gene that encodes a novel Ca<sup>2+</sup>-binding protein. *Development* **121**: 2267-2279.
- Andres A.J., Fletcher J.C., Karim F.D. a Thummel C.S. (1993) Molecular analysis of the initiation of insect metamorphosis: a comparative study of *Drosophila* ecdysteroid-regulated transcription. *Dev. Biol.* **160**: 388-404.
- Antoniewski C., Laval M., Dahan A. a Lepesant J.A. (1994) The ecdysone response enhancer of the *Fbp1* gene of *Drosophila melanogaster* is a direct target for the EcR/USP nuclear receptor. *Molec. Cell. Biol.* **14**: 4465-4474.
- Antoniewski C., O'Grady M.S., Edmondson R.G., Lassieur S.M. a Benes H. (1995) Characterization of an EcR/USP heterodimer target site that mediates ecdysone responsiveness of the *Drosophila* *Lsp-2* gene. *Molec. Gen. Genet.* **249**: 545-556.
- Antoniewski C., Mugat B., Delbac F. a Lepesant J.A. (1996) Direct repeats bind the EcR/USP receptor and mediate ecdysteroid responses in *Drosophila melanogaster*. *Molec. Cell. Biol.* **16**: 2977-2986.
- Arbeitman M.N. a Hogness D.S. (2000) Molecular chaperones activate the *Drosophila* ecdysone receptor, an RXR heterodimer. *Cell* **101**: 67-77.
- Ashburner M. (1967) Patterns of puffing activity in the salivary gland chromosomes of *Drosophila melanogaster*. I. Autosomal puffing patterns in a laboratory stock. *Chromosoma* **21**:398-428.
- Ashburner M. (1969) Patterns of puffing activity in the salivary gland chromosomes of *Drosophila melanogaster*. IV. Variability of puffing patterns. *Chromosoma* **27**:156-177.
- Ashburner M. (1971) Induction of puffs in polytene chromosomes of in vitro cultured salivary glands of *Drosophila melanogaster* by ecdysone and ecdysone analogues. *Nature* **230**: 222-224.
- Ashburner M. (1972a) Puffing patterns in *Drosophila melanogaster* and related species. In: Beerman, W. ed. *Developmental Studies on Giant Chromosomes*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York; pp.101-151.
- Ashburner M. (1972b) Patterns of puffing activity in the salivary gland chromosomes of *Drosophila*. VI. Induction by ecdysone in salivary glands of *D. melanogaster* cultured in vitro. *Chromosoma* **38**: 255-281.
- Ashburner M. (1972c) Ecdysone induction of puffing in polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster*. Effects of inhibitors of RNA synthesis. *Exp. Cell Res.* **71**: 433-440.
- Ashburner M. (1973) Sequential gene activation by ecdysone in polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster*. I. Dependence upon ecdysone concentration. *Devel. Biol.* **35**: 47-61.
- Ashburner M. (1974) Sequential gene activation by ecdysone in polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster*. II. The effects of inhibitors of protein synthesis. *Devel. Biol.* **39**:141-157.
- Ashburner M. (1990) Puffs, genes, and hormones revisited. *Cell* **61**:1-3.
- Ashburner M. a Berendes H.D. (1978) Puffing of polytene chromosomes. In: Ashburner M. a Wright T.R.F. eds. *The Genetics and Biology of Drosophila*, vol 2b. Academic Press, London and New York; pp. 315-395.
- Ashburner M., Chihara C., Meltzer P. a Richards G. (1974) Temporal control of puffing activity in polytene chromosomes. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **38**: 655-662.
- Ashburner M. a Richards G. (1976) Sequential gene activation by ecdysone in polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster*. III. Consequences of ecdysone withdrawal. *Devel. Biol.* **54**: 241-255.
- Ayer S., Walker N., Mosammamparast M., Nelson J.P., Shilo B.Z. a Benyajati C. (1993) Activation and repression of *Drosophila* alcohol dehydrogenase distal transcription by two steroid hormone receptor superfamily members binding to a common response element. *Nucl. Acid. Res.* **21**: 1619-1627.
- Baehrecke E.H. a Thummel C.S. (1995) The *Drosophila* *E93* gene from the 93F early puff displays stage-and tissue-specific regulation by 20-hydroxyecdysone. *Dev. Biol.* **171**: 85-97.
- Bayer C.A., Holley B. a Fristrom J.W. (1996) A switch in broad-complex zinc-finger isoform expression is regulated posttranscriptionally during the metamorphosis of *Drosophila* imaginal discs. *Dev. Biol.* **177**: 1-14.
- Bayer C.A., von Kalm L. a Fristrom J.W. (1997) Relationships between protein isoforms and

- genetic functions demonstrate functional redundancy at the *Broad-Complex* during *Drosophila* metamorphosis. *Dev. Biol.* **187**: 267-282.
- Beckendorf S.K. a Kafatos F.C. (1976) Differentiation in the salivary glands of *Drosophila melanogaster*: characterization of the glue proteins and their developmental appearance. *Cell* **9**: 365-373.
- Becker H.J. (1959) Die Puffs der Speicheldrüsenchromosomen von *Drosophila melanogaster*. I. Beobachtungen zum Verhalten des Puffmuster im Normalstamm und bei zwei Mutanten, *giant* und *lethal-giant-larvae*. *Chromosoma* **10**: 654-678.
- Becker H.J. (1962) Die Puffs der Speicheldrüsenchromosomen von *Drosophila melanogaster*. II. Die Auslösung der Puffbildung, ihre Spezifität und ihre beziehung zur Funktion der Rindgrüse. *Chromosoma* **13**: 341-384.
- Belinski-Deutsch S., Busson D., Lamour-Audit C., Porcheron P., Moriniere M. a Berreur P. (1983) Relations between ecdysteroid levels and pupal development in the *ecd-1* temperature sensitive mutant of *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Physiol.* **29**: 509-514.
- Belyaeva E.S., Vlassova I.E., Biyasheva Z.M., Kakpakov V.T., Richards G. a Zhimulev I.F. (1981) Cytogenetic analysis of the 2B3-4-2B11 region of the X chromosome of *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma* **84**: 207-219.
- Belyaeva E.S., Protopov M.O., Barucheva E.M., Semeshin V.F., Izquierdo M.L. a Zhimulev I.F. (1987) Cytogenetic analysis of region 2B3-4-2B11 of the X-chromosome of *Drosophila melanogaster*. VI. Molecular and cytological mapping of the *ecs* locus and the 2B puff. *Chromosoma* **95**: 295-310.
- Berendes H.D. (1972) The control of puffing in *Drosophila hydei*. In: *Developmental Studies on Giant Chromosomes*. Beermann W. ed.; Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, pp. 181-207.
- Berreur P., Porcheron P., Berreur-Bonnenfant J. a Simpson A (1979) Ecdysteroid levels and pupariation in *Drosophila melanogaster*. *J. Exp. Zool.* **210**: 347-352.
- Berreur P., Porcheron P., Moriniere M., Berreur-Bonnenfant J., Belinski-Deutsch S., Busson D. a Lamour-Audit C (1984) Ecdysteroids during the third larval instar in *l(3)ecd<sup>1ts</sup>*, a temperature-sensitive mutant of *Drosophila melanogaster*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **54**: 76-84.
- Borst D.W., Bollenbacher W.E., O'Connor J.D., King D.S. a Fristrom J.W. (1974) Ecdysone levels during metamorphosis of *Drosophila melanogaster*. *Devel. Biol.* **39**: 308-316.
- Carroll S.B. a Scott M.P. (1986) Zygotically active genes that affect the spatial expression of the *fushi tarazu* segmentation gene during early *Drosophila* embryogenesis. *Cell* **45**: 113-126.
- Chen C.N., Malone T., Beckendorf S.K. a Davis R.L. (1987) At least two genes reside within a large intron of the *dunce* gene of *Drosophila*. *Nature* **329**: 721-724.
- Cherbas L., Schulz R.A., Koehler M.M.D., Savais C. a Cherbas P. (1986) Structure of the *Eip28/29* gene, an ecdysone-inducible gene from *Drosophila*. *J. Molec. Biol.* **189**: 617-631.
- Cherbas L., Lee K.-S. a Cherbas P. (1991) Identification of ecdysone response elements by analysis of the *Drosophila Eip28/29* gene. *Genes Dev.* **5**: 120-131.
- Christopherson K.S., Mark M.R., Bajaj V. a Godowski P.J. (1992) Ecdysteroid-dependent regulation of genes in mammalian cells by a *Drosophila* ecdysone receptor and chimeric transactivators. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 6314-6318.
- Clever U. (1964) Actinomycin and puromycin: effects on sequential gene activation by ecdysone. *Science* **146**: 794-795.
- Clever U. a Karlson P. (1960) Induktion von Puff-veränderungen in den Speicheldrüsen-chromosomen von *Chironomus tentans* durch Ekdysone. *Exp. Cell Res.* **20**: 623-626.
- Clever U. a Romball C.G. (1966) RNA and protein synthesis in the cellular response to a hormone, ecdysone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **56**: 1470-1476.
- Crosby M.A. a Meyerowitz E.M. (1986) *Drosophila* glue gene *Sgs3*: Sequences required for puffing and transcriptional regulation. *Devel. Biol.* **118**: 593-607.
- Crossgrove K., Bayer C.A., Fristrom J.W. a Guild G.M. (1996) The *Drosophila Broad-Complex* early gene directly regulates late gene transcription during the ecdysone-induced puffing cascade. *Dev. Biol.* **180**: 745-758.
- Crowley T.E., Bond M.W. a Meyerowitz E.M. (1983) The structural genes for three *Drosophila* glue proteins reside at a single polytene chromosome puff locus. *Molec. Cell. Biol.* **3**: 623-634.
- Crowley T.E., Mathers P.H. a Meyerowitz E.M. (1984) A *trans*-acting regulatory product necessary for expression of the *Drosophila melanogaster* 68C glue gene cluster. *Cell* **39**: 149-156.
- Crowley T.E. a Meyerowitz E.M. (1984) Steroid regulation of RNAs transcribed from the

- Drosophila* 68C polytene chromosome puff. *Devel. Biol.* **102**: 110-121.
- DeReggi M.L., Hirn M.H. a Delaage M.A. (1975) Radioimmunoassay of ecdysone: an application to *Drosophila* larvae and pupae. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **66**: 1307-1315.
- DiBello P.R., Withers D.A., Bayer C.A., Fristrom J.W. a Guild G.M. (1991) The *Drosophila Broad-Complex* encodes a family of related proteins containing zinc fingers. *Genetics* **129**: 385-397.
- Dobens L., Rudolph K. a Berger E.M. (1991) Ecdysterone regulatory elements function as both transcriptional activators and repressors. *Molec. Cell. Biol.* **11**: 1846-1853.
- Egea P.F., Klaholz B.P. a Moras D. (2000) Ligand-protein interactions in nuclear receptors of hormones. *FEBS Lett.* **476**: 62-67.
- Emery I.F., Bedian V. a Guild G.M. (1994) Differential expression of Broad-Complex transcription factors may forecast tissue-specific developmental fates during *Drosophila* metamorphosis. *Development* **120**: 3275-3287.
- Enghofer E. a Kress H. (1980) Glucosamine metabolism in *Drosophila virilis* salivary gland cells: ontogenic changes of enzyme activities and metabolic changes. *Devel. Biol.* **78**: 63-75.
- Farkaš R. (1989) Genes in ecdysteroid-responsive puffs of *Drosophila* salivary gland chromosomes code for polyA positive as well as polyA negative messenger RNA. *Gen. Comp. Endocrinol.* **74**: 249
- Farkaš R. (1991) Hormonálna regulácia génovej expresie u *Drosophila melanogaster*. PhD Thesis; Univerzita Komenského Bratislava.
- Farkaš R. a Knopp J. (1997) Ecdysone-modulated response of *Drosophila* cytosolic malate dehydrogenase to juvenile hormone. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **35**: 71-83.
- Farkaš R. a Knopp J. (1998) Genetic and hormonal control of cytosolic malate dehydrogenase activity in *Drosophila melanogaster*. *Gen. Physiol. Biophys.* **17**: 37-50.
- Farkaš R. a Mechler B.M. (2000) The timing of *Drosophila* salivary gland apoptosis displays an *l(2)gl*-dose response. *Cell Death Diffn.* **7**: 89-101.
- Farkaš R. a Šuťáková G. (1998) Ultrastructural changes of *Drosophila* larval and prepupal salivary glands cultured *in vitro* with ecdysone. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* **34**: 813-823.
- Fisk G.J. a Thummel C.S. (1995) Isolation, regulation, and DNA-binding properties of three *Drosophila* nuclear hormone receptor superfamily members. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**: 10604-10608.
- Fletcher J.C., D'Avino P.P. a Thummel C.S. (1997) A steroid-triggered switch in *E74* transcription factor isoforms regulates the timing of secondary-response gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 4582-4586.
- Forman B.M., Chen J. a Evans R.M. (1996) The peroxisome proliferator-activated receptors: ligands and activators. *Ann. NY Acad. Sci.* **804**: 266-275.
- Fraenkel G. a Brookes V.J. (1953) The process by which the puparia of many species of flies become fixed to a substrate. *Biol. Bull. Wood's Hole* **105**: 442-449.
- Furia M., Digilio F.A., Artiano D., Favia G. a Polito L.C. (1992) Molecular characterization of a *Drosophila melanogaster* variant strain defective in the *Sgs-4* gene dosage compensation. *Biochim. Biophys. Acta* **1130**: 314-316.
- Garen A., Kauver L. a Lepesant J.A. (1977) Roles of ecdysone in *Drosophila* development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5099-5103.
- Garfinkel M.D., Pruitt R.E. a Meyerowitz E.M. (1983) DNA sequences, gene regulation and modular protein evolution in the *Drosophila* 68C glue gene cluster. *J. Molec. Biol.* **168**: 765-789.
- Garza D., Cottrill T., Hock T. a Thompson C. (2000) Flies pumping steroids ? The *E23* early gene encodes an ABC transporter capable of modulating hormone responses. 41th Annual *Drosophila* Research Conference, Pittsburgh, Abstract 672B.
- Guild G.M. (1984) Molecular analysis of a developmentally regulated gene which is expressed in the larval salivary gland of *Drosophila*. *Devel. Biol.* **102**: 462-470.
- Guild G.M. a Shore E.M. (1984) Larval salivary gland secretion proteins in *Drosophila*. Identification and characterization of the *Sgs-5* structural gene. *J. Molec. Biol.* **179**: 289-314.
- Hall B.L. a Thummel C.S. (1998) The RXR homolog ultraspiracle is an essential component of the *Drosophila* ecdysone receptor. *Development* **125**: 4709-4717.
- Hansson L. a Lambertson A. (1983) The role of *su(f)* gene function and ecdysterone in transcription of glue polypeptide mRNAs in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Gen. Genet.* **192**: 395-401.
- Henrich V.C., Szekely A.A., Kim S.J., Brown N.E., Antoniewski C., Hayden M.A., Lepesant J.A. a

- Gilbert L.I. (1994) Expression and function of the *ultraspiracle (usp)* gene during development of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* **165**: 38-52.
- Hill R.J., Segraves W.A., Choi D., Underwood P.A. a Macavoy E. (1993) The reaction with polytene chromosomes of antibodies raised against *Drosophila* E75A protein. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **23**: 99-104.
- Hodgetts R.B., Clark W.C., O'Keefe S.L., Schouls M., Crossgrove K., Guild G.M. a von Kalm L. (1995) Hormonal induction of Dopa decarboxylase in the epidermis of *Drosophila* is mediated by the Broad-Complex. *Development* **121**: 3913-3922.
- Hodgetts R.B., Sage B. a O'Connor J.D. (1977) Ecdysone titers during postembryonic development of *Drosophila melanogaster*. *Devel. Biol* **60**: 310-317.
- Horner M.A., Chen T. a Thummel C.S. (1995) Ecdysteroid regulation and DNA binding properties of *Drosophila* nuclear hormone receptor superfamily members. *Dev. Biol.* **168**: 490-502.
- Hurban P. a Thummel C.S. (1993) Isolation and characterization of fifteen ecdysone-inducible *Drosophila* genes reveal unexpected complexities in ecdysone regulation. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 7101-7111.
- Jiang C., Baehrecke E.H. a Thummel C.S. (1997) Steroid regulated programmed cell death during *Drosophila* metamorphosis. *Development* **124**: 4673-4683.
- Jiang C., Lamblin A.F.J., Steller H. a Thummel C.S. (2000) A steroid-triggered transcriptional hierarchy controls salivary gland cell death during *Drosophila* metamorphosis. *Molec. Cell* **5**: 445-455.
- Jürgens G., Wieschaus E., Nüsslein-Volhard C. a Kluding H. (1984) Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster*. II. Zygotic loci on the third chromosome. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **193**: 283-295.
- Karim F.D. a Thummel C.S. (1991) Ecdysone coordinates the timing and amounts of *E74A* and *E74B* transcription in *Drosophila*. *Genes Dev.* **5**: 1067-1079.
- Karim F. a Thummel C.S. (1992) Temporal coordination of regulatory gene expression by the steroid hormone ecdysone. *EMBO J.* **11**: 4083-4093.
- Kiss I., Beaton A.H., Fristrom D. a Fristrom J.W. (1988) Interactions and developmental effects of mutations in the Broad-Complex of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **118**: 247-259.
- Klose W., Gateff E., Emmerich H. a Beikirch H. (1980) Developmental studies on two ecdysone deficient mutants of *Drosophila melanogaster*. *Roux's Arch. Devel. Biol.* **189**: 57-67.
- Koelle M., Talbot W.S., Segraves W.A., Bender M.T., Cherbas P. a Hogness D.S. (1991) The *Drosophila EcR* gene encodes an ecdysone receptor, a new member of the steroid receptor superfamily. *Cell* **67**: 59-77.
- Koelle M., Segraves W.A. a Hogness D.S. (1992) DHR3: a *Drosophila* steroid receptor homolog. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 6167-6171.
- Korge G. (1975) Chromosome puff activity and protein synthesis in larval salivary glands of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**: 4550-4554.
- Korge G. (1977a) Larval saliva in *Drosophila melanogaster*: production, composition, and relationship to chromosome puffs. *Devel. Biol.* **58**: 339-355.
- Korge G. (1977b) Direct correlation between a chromosome puff and the synthesis of a larval saliva protein in *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma* **62**: 155-174.
- Kozlova T., Pokholkova G.V., Tzertzinis G., Sutherland J.D., Zhimulev I.F. a Kafatos F.C. (1998) *Drosophila* hormone receptor 38 functions in metamorphosis. A role in adult cuticle formation. *Genetics* **149**: 1465-1475.
- Kress H. (1977) Transcriptional control of developmental processes by ecdysone in *Drosophila virilis* salivary glands. *Roux's Arch. Devel. Biol.* **182**: 107-116.
- Lam G.T., Jiang C. a Thummel C.S. (1997) Coordination of larval and prepupal gene expression by the DHR3 orphan receptor during *Drosophila* metamorphosis. *Development* **124**: 1757-1769.
- Lam G.T., Hall B.L., Bender M. a Thummel C.S.. (1999) DHR3 is required for the prepupal-pupal transition and differentiation of adult structures during *Drosophila* metamorphosis. *Dev. Biol.* **212**: 204-216.
- Lavorgna G., Ueda H., Clos J. a Wu C. (1991) FTZ-F1, a steroid hormone receptor-like protein implicated in the activation of *fushi tarazu*. *Science* **252**: 848-851.
- Lavorgna G., Karim F.D., Thummel C.S. a Wu C. (1993) Potential role for a FTZ-F1 steroid receptor superfamily member in the control of *Drosophila* metamorphosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 3004-3008.
- Le Douarin B., Nielsen A.L., You J., Chambon P. a Losson R. (1997) TIF1 alpha: a chromatin-

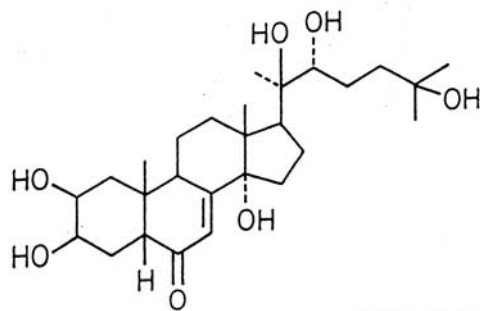
- specific mediator for the ligand-dependent activation function AF-2 of nuclear receptors? *Biochem. Soc. Trans.* **25**: 605-612.
- Lehmann M. (1996) *Drosophila Sgs* genes: stage and tissue specificity of hormone responsiveness. *BioEssays* **18**: 47-54.
- Lehmann M. a Korge G. (1995) Ecdysone regulation of the *Drosophila Sgs-4* gene is mediated by the synergistic action of ecdysone receptor and SEBP 3. *EMBO J.* **14**: 716-726.
- Lehmann M. a Korge G. (1996) The *fork head* product directly specifies the tissue-specific hormone responsiveness of the *Drosophila Sgs-4* gene. *EMBO J.* **15**: 4825-4834.
- Lehmann M., Wattler F. a Korge G. (1997) Two new regulatory elements controlling the *Drosophila Sgs-3* gene are potential ecdysone receptor and fork head binding sites. *Mech. Dev.* **62**: 15-27.
- LeMaire M.F. a Thummel C.S. (1990) Splicing precedes polyadenylation during *Drosophila E74A* transcription. *Mol. Cell. Biol.* **10**: 6059-6063.
- Lewis E.B. (1978) A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* **276**: 565-570.
- Lewis E.B. a Bacher F. (1968) Methods of feeding ethyl methane sulfonate (EMS) to *Drosophila* males. *Dros. Inf. Serv.* **43**: 193.
- Limbourg B. a Zalokar M. (1973) Permeabilization of *Drosophila* eggs. *Dev. Biol.* **35**: 382-387.
- Mark M., Ghyselinck N.B., Wendling O., Dupe V., Mascrez B., Kastner P. a Chambon P. (1999) A genetic dissection of the retinoid signalling pathway in the mouse. *Proc. Nutr. Soc.* **58**: 609-613.
- Meyerowitz E.M. a Hogness D.S. (1982) Molecular organization of a *Drosophila* puff site that responds to ecdysone. *Cell* **28**: 165-176.
- Moras D. a Gronemeyer H. (1998) The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **10**: 384-391.
- Mortin M.A. a Lefevre G. (1981) An RNA polymerase II-mutation in *Drosophila melanogaster* that mimics ultrabithorax. *Chromosoma* **82**: 237-247.
- Muskavitch M.A. a Hogness D.S. (1980) Molecular analysis of a gene in a developmentally regulated puff of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77**: 7362-7366.
- Muskavitch M.A. a Hogness D.S. (1982) An expandable gene that encodes a *Drosophila* glue protein is not expressed in variants lacking remote upstream sequences. *Cell* **29**: 1041-1051.
- Nagy L., Kao H.Y., Chakravarti D., Lin R.J., Hassig C.A., Ayer D.E., Schreiber S.L. a Evans R.M. (1997) Nuclear receptor repression mediated by a complex containing SMRT, mSin3A, and histone deacetylase. *Cell* **89**: 373-380.
- Nauber U., Pankratz M.J., Kienlin A., Seifert E., Klemm U. a Jäckle H. (1988) Abdominal segmentation of the *Drosophila* embryo requires a hormone receptor-like protein encoded by the gap gene *knirps*. *Nature* **336**: 489-492.
- Niedziela-Majka A., Kochman M. a Ozyhar A. (2000) Polarity of the ecdysone receptor complex interaction with the palindromic response element from the *hsp27* gene promoter. *Europ. J. Biochem.* **267**: 507-519.
- No D., Yao T.P. a Evans R.M. (1996) Ecdysone-inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 3346-3351.
- Nüsslein-Volhard C. a Wieschaus E. (1980) Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* **287**: 795-801.
- Nüsslein-Volhard C., Wieschaus E. a Kluding H. (1984) Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster*. I. Zygotic loci on the second chromosome. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **193**: 267-282.
- Ohno C.K., Ueda H. a Petkovich M. (1994) The *Drosophila* nuclear receptors FTZ-F1 alpha and FTZ-F1 beta compete as monomers for binding to a site in the *fushi tarazu* gene. *Molec. Cell. Biol.* **14**: 3166-3175.
- Oro A.E., McKeown M. a Evans R.M. (1990) Relationship between the product of the *Drosophila ultraspiracle* locus and the vertebrate retinoid X receptor. *Nature* **347**: 298-301.
- Pecasse F., Beck Y., Ruiz C. a Richards G. (2000) *Krüppel-homolog*, a stage-specific modulator of the prepupal ecdysone response, is essential for *Drosophila* metamorphosis. *Devel. Biol.* **221**: 53-67.
- Pelling C. (1959) Chromosomal synthesis of ribonucleic acid as shown by incorporation of uridine labelled with tritium. *Nature* **184**: 655-656.
- Redfern C.P.F. (1984) Evidence for the presence of makisterone A in *Drosophila* larvae and the secretion of 20-deoxymakisterone A by the ring-gland. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 5643-5647.
- Richards G.P. (1976a) The control of prepupal puffing patterns in vitro: implications for prepupal

- ecdysone titres in *Drosophila melanogaster*. *Devel. Biol.* **48**: 191-195.
- Richards G.P. (1976b) Sequential gene activation by ecdysone in polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster*. IV. The mid prepupal period. *Devel. Biol.* **54**: 256-263.
- Richards G.P. (1976c) Sequential gene activation by ecdysone in polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster*. V. The late prepupal puffs. *Devel. Biol.* **54**: 264-275.
- Richards G.P. (1981) The radioimmune assay of ecdysteroid titres in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell Endocrinol* **21**: 181-197.
- Riddihough G. a Pelham H.R.B. (1987) An ecdysone response element in the *Drosophila hsp27* promoter. *EMBO J.* **16**: 3729-3734.
- Roth G.E., Wattler S., Bornschein H., Lehmann M. a Korge G. (1999) Structure and regulation of the salivary gland secretion protein gene *Sgs-1* of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **153**: 753-762.
- Russell S.R., Heimbeck G., Goddard C.M., Carpenter A.T. a Ashburner M. (1996) The *Drosophila Eip78C* gene is not vital but has a role in regulating chromosome puffs. *Genetics* **144**: 159-170.
- Sandler L., Lindsley D.L., Nicoletti B. a Trippa G. (1968) Mutants affecting meiosis in natural populations of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **60**: 525-558.
- Sauer K., Weigmann K., Sigrist S. a Lehner C.F. (1996) Novel members of the cdc2-related kinase family in *Drosophila*: cdk4/6, cdk5, PFTAIRE, and PITSLRE kinase. *Mol. Biol. Cell.* **7**: 1759-1769.
- Savakis C., Demetri G. a Cherbas P. (1980) Ecdysteroid-inducible polypeptides in a *Drosophila* cell line. *Cell* **22**: 665-674.
- Savakis C., Koehler M.M.D. a Cherbas P. (1984) cDNA clones for the ecdysone-inducible polypeptide (EIP) mRNAs of *Drosophila* Kc cells. *EMBO J.* **13**: 235-243.
- Sawicki J.A., Monks B. a Morris R. (1998) Cell-specific ecdysone-inducible expression of FLP recombinase in mammalian cells. *BioTechniques* **25**: 868-875.
- Schupbach T. a Wieschaus E. (1986) Maternal-effect mutations altering the anterior-posterior pattern of the *Drosophila* embryo. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **195**: 302-317.
- Smith T. a Bownes M. (1985) Metabolism of 20-hydroxyecdysone in adult *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem.* **15**: 749-754.
- Snyder R.D. a Smith P.D. (1976) The suppressor of forked mutation in *Drosophila melanogaster*: interaction with lozenge gene. *Biochem. Genet.* **14**: 611-617.
- Sommé-Martin G., Colardeau J. a Lafont R. (1988) Conversion of ecdysone and 20-hydroxyecdysone into 3-dehydroecdysteroids is a major pathway in third instar *Drosophila melanogaster* larvae. *Insect Biochem.* **18**: 729-734.
- Stone B.L. a Thummel C.S. (1993) The *Drosophila* 78C early late puff contains *E78*, an ecdysone-inducible gene that encodes a novel member of the nuclear hormone receptor superfamily. *Cell* **75**: 307-320.
- Stowers R.S., Russell S. a Garza D. (1999) The 82F late puff contains the *L82* gene, an essential member of a novel gene family. *Dev. Biol.* **213**: 116-130.
- Sutherland J.D., Kozlova T., Tzertzinis G. a Kafatos F.C. (1995) *Drosophila* hormone receptor 38: a second partner for *Drosophila* USP suggests an unexpected role for nuclear receptors of the nerve growth factor-induced protein B type. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**: 7966-7970.
- Talbot W.S., Swyryd E.A. a Hogness D.S. (1993) *Drosophila* tissues with different metamorphic responses to ecdysone express different ecdysone receptor isoforms. *Cell* **73**: 1323-1337.
- Thomas H.E., Stunnenberg H.G. a Stewart A.F. (1993) Heterodimerization of the *Drosophila* ecdysone receptor with retinoid X receptor and ultraspiracle. *Nature* **362**: 471-475.
- Thummel C.S. (1989) The *Drosophila E74* promoter contains essential sequences downstream from the start site of transcription. *Genes Dev.* **3**: 782-792.
- Thummel C.S. (1992) Mechanisms of transcriptional timing in *Drosophila*. *Science* **255**: 39-40
- Thummel C.S., Burtis K.C. a Hogness D.S. (1990) Spatial and temporal patterns of *E74* transcription during *Drosophila* development. *Cell* **61**: 101-111.
- Tsai C.C., Kao H.Y., Yao T.P., McKeown M. a Evans R.M. (1999) SMRTER, a *Drosophila* nuclear receptor coregulator, reveals that EcR-mediated repression is critical for development. *Molec. Cell* **4**: 175-186.
- Urness L.D. a Thummel C.S. (1990) Molecular interactions within the ecdysone regulatory hierarchy: DNA binding properties of the *Drosophila* ecdysone-inducible *E74A* protein. *Cell* **63**: 47-61.
- Vellissariou V. a Ashburner M. (1980) The secretory proteins of the larval salivary glands of *Drosophila melanogaster*. Cytogenetic correlations of a protein and a puff. *Chromosoma*

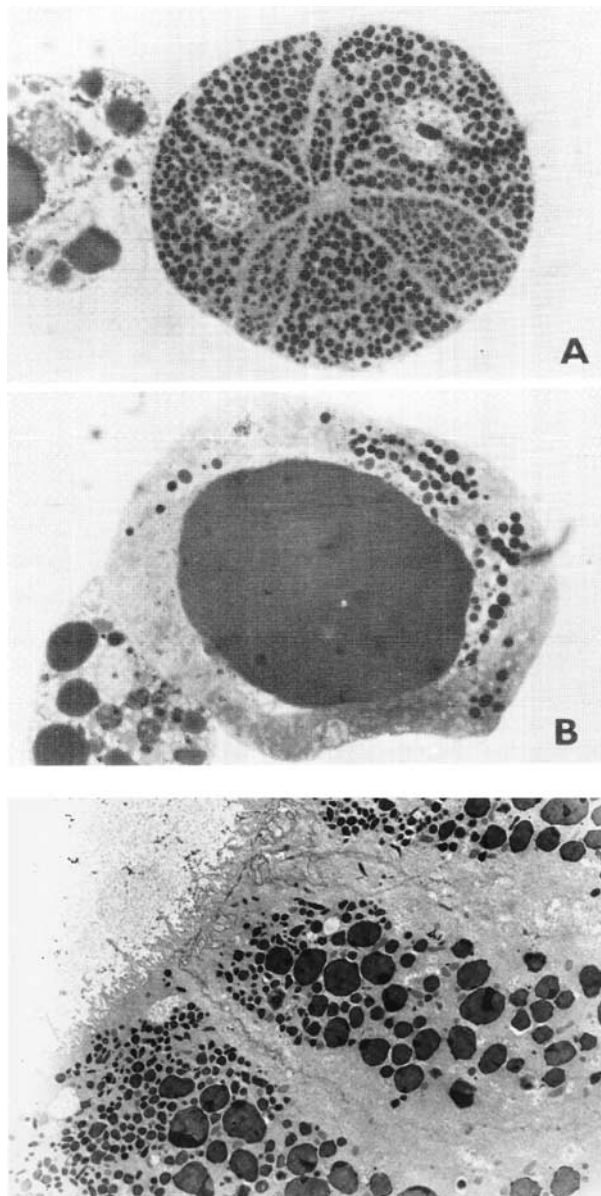


177: 13-27.

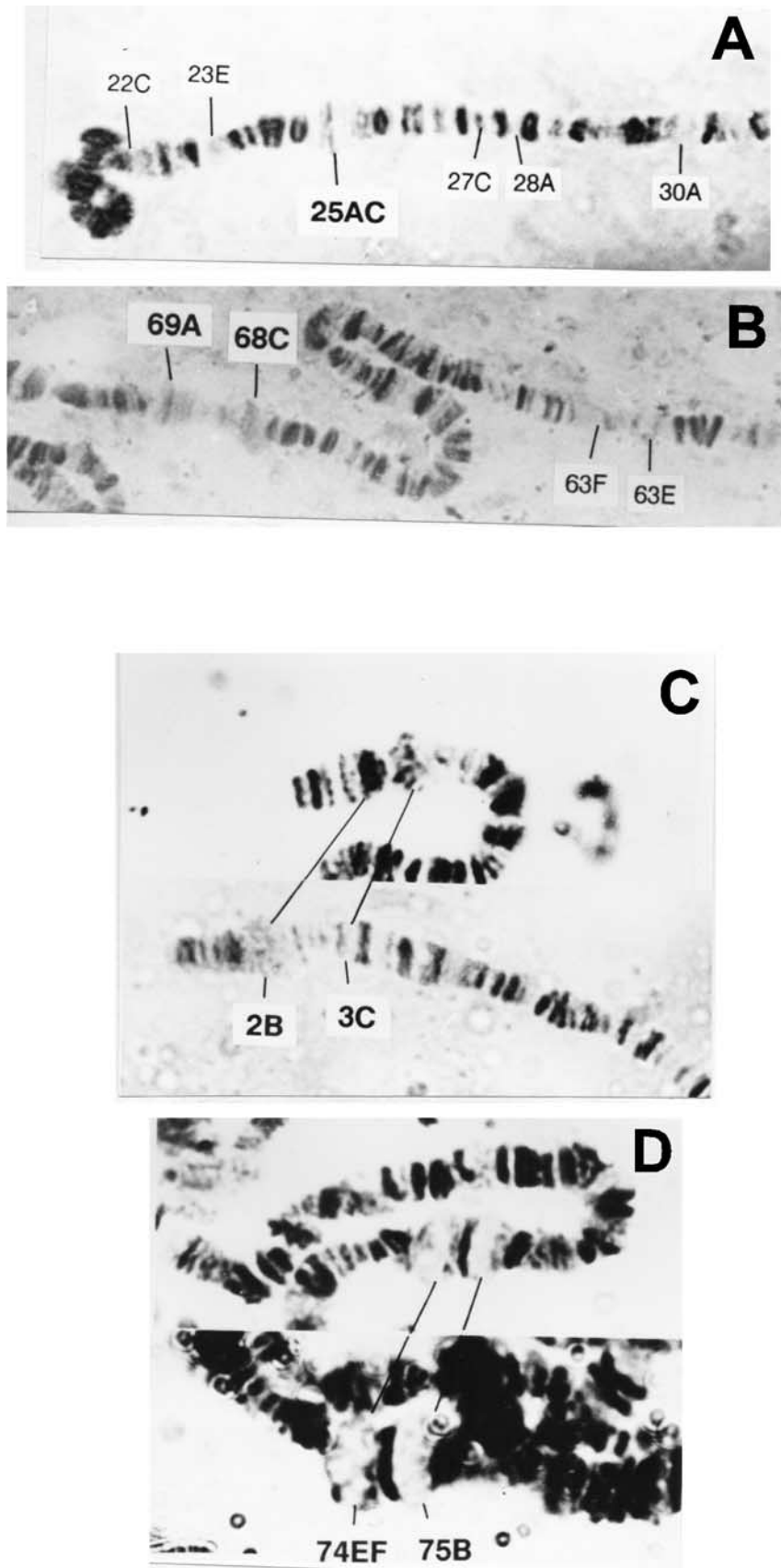
- Vellissariou V. a Ashburner M. (1981) Cytogenetic and genetic mapping of a salivary gland secretion protein in *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma* **184**: 173-185.
- Waddington C.H. (1939) Preliminary notes on the development of the wings in normal and mutant strains of *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **25**: 299-307.
- Walker V.K. a Ashburner M. (1981) The control of ecdysterone-regulated puffs in *Drosophila* salivary glands. *Cell* **26**: 269-277.
- Wang S.-F., Ayer S., Segraves W.A., Williams D.R. a Raikhel A.S. (2000) Molecular determinants of differential ligand sensitivities of insect ecdysteroid receptor. *Molec. Cell. Biol.* **20**: 3870-3879.
- White K.P., Hurban P., Watanabe T. a Hogness D.S. (1997) Coordination of *Drosophila* metamorphosis by two ecdysone-induced nuclear receptors. *Science* **276**: 114-117.
- Wieschaus E. a Nüsslein-Volhard C. (1986) Looking at embryos. In: *Drosophila, A Practical Approach*; Roberts D.B. ed., IRL Press Oxford; pp. 199-227.
- Wieschaus E., Nüsslein-Volhard C. a Jurgens G. (1984) Mutations affecting the pattern of the larval cuticle in *Drosophila melanogaster*. III. Zygotic loci on the X-chromosome and fourth chromosome. *Roux's Arch. Dev. Biol.* **193**: 296-307.
- Woodard C.T., Baehrecke E.H. a Thummel C.S. (1994) A molecular mechanism for the stage specificity of the *Drosophila* prepupal genetic response to ecdysone. *Cell* **79**: 607-615.
- Wright L.G., Chen T., Thummel C.S. a Guild G.M. (1996) Molecular characterization of the 71E late puff in *Drosophila melanogaster* reveals a family of novel genes. *J. Molec. Biol.* **255**: 387-400.
- Yao T.P., Segraves W.A., Oro A.E., McKeown M. a Evans R.M. (1992) *Drosophila* ultraspiracle modulates ecdysone receptor function via heterodimer formation. *Cell* **71**: 63-72.
- Yao T.P., Forman B.M., Jiang Z., Cherbas L., Chen J.D., McKeown M., Cherbas P. a Evans R.M. (1993) Functional ecdysone receptor is the product of *EcR* and *Ultraspiracle* genes. *Nature* **366**: 476-479.
- Zalokar M. (1981) A method for injection and transplantation of nuclei and cells in *Drosophila* eggs. *Experientia* **37**: 1354-1356.
- Zelhof A.C., Yao T.P., Evans R.M. a McKeown M. (1995a) Identification and characterization of a *Drosophila* nuclear receptor with the ability to inhibit the ecdysone response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 10477-10481.
- Zelhof A.C., Yao T.P., Chen J.D., Evans R.M. a McKeown M. (1995b) Seven-up inhibits ultraspiracle-based signaling pathways *in vitro* and *in vivo*. *Molec. Cell. Biol.* **15**: 6736-6745.
- Zhimulev I.F., Vlassova I.E. a Belyaeva E.S. (1982) Cytogenetic analysis of the 2B3-4-2B11 region of the X chromosome of *Drosophila melanogaster*. III. Puffing disturbance in salivary gland chromosomes of homozygotes for mutation *l(1)pp1<sup>110</sup>*. *Chromosoma* **85**: 659-672.



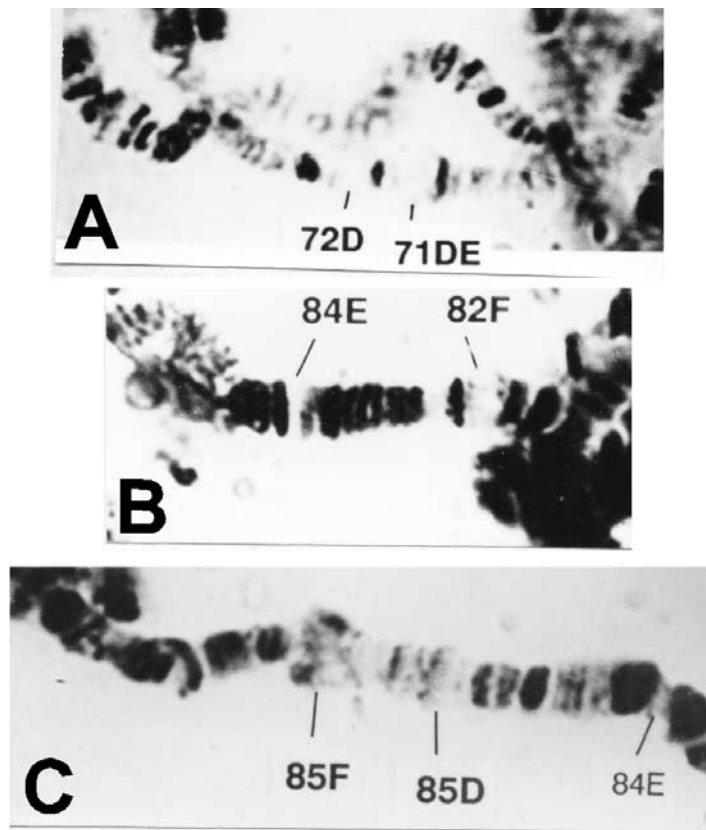
Obr. 1 Chemická štruktúra 20-hydroxyekdyzonu.



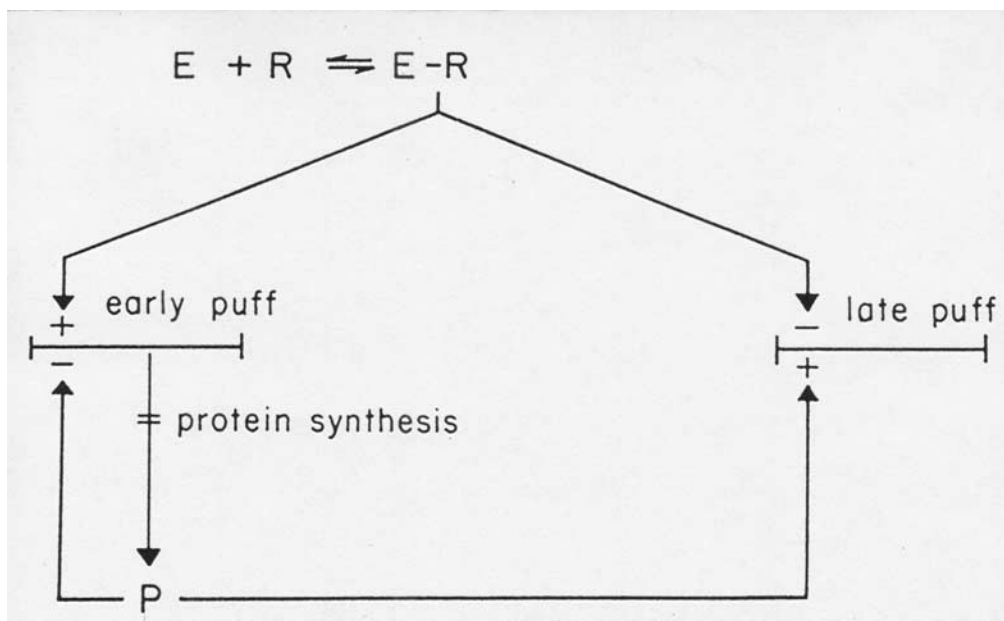
Obr. 2 Panel A: Transverzálny rez cez slinnú žľazu štádia PS1 až PS4 s úzkym centrálne uloženým lúmenom a množstvom sekrečných granúl.  
 Panel B: Transverzálny rez cez slinnú žľazu štádia PS6 až PS7 so širokým lúmenom naplneným sekkrétom a "vyprázdnenými" bunkami ako následok účinku ekdyzonu.  
 Panel C: Ultraštruktúra slinnej žľazy štádia PS1 so sekrečnými granulami v cytoplazme a časťou lúmenu.



Obr. 3 Panel A: druhý chromozóm s prominentným interekdyziálnym pufom 25B.  
 Panel B: tretí chromozóm s interekdyziálnym pufom 68C.  
 Panel C: represia interekdyziálneho pufu 3C a indukcia skorého pufu 2B5 na distálnom konci X chromozómu pri prechode z PS1 (horná časť) do PS2 (dolná časť).  
 Panel D: skoré ekdyzon-inducibilné pufy 74EF a 75B v PS3 (hore) a v PS6 (dolu).



Obr. 4 Panel A: tretí chromozóm so sekundárnymi skorými pufmi 71DE a 72D.  
 Panel B: tretí chromozóm s veľmi neskorým larválnym pufom 82F.  
 Panel C: pufy 85D a 85F z prechodnej fázy štádia PS13/14 z larválneho na prepupálny cyklus puffingu.



Obr. 5 "Ashburnerov" model, v ktorom hormón ekdyzon (E) v komplexe s receptorom (R) aktivuje skoré (early) pufy a súčasne inhibuje predčasnú aktiváciu neskorých (late) pufov. Proteosyntéza je nevyhnutná k represii skorých aj indukcii neskorých pufov.