w wieku święty Zachariasz i święta Elżbieta. Owocem tej aktywności był święty Jan Chrzciciel. Być może nadmierna aktywność seksualna spowodowała mały wylew u św. Zachariasza, który przejściowo stracił mowę, kiedy dowiedział się o ciąży swej starej żony od archanioła Gabriela.

Długotrwałe utrzymanie więzi partnerskiej ma istotne znaczenie dla dalszego zapewniania najlepszych warunków przeżycia naszego materiału genetycznego. Wydaje się, że to właśnie spowodowało, że ewolucja preferuje długowieczność człowieka.

Prof. dr hab. Jerzy Vetulani, neuropsychofarmakolog, członek PAU, PAN i EDAB, jest profesorem MWSZ im. Józefa Dietla i Instytutu Farmakologii PAN w Krakowie. E-mail: nfvetula@cyfronet.pl.

GENETYKA SYSTEMU GAL4/UAS, CZYLI JAK WYWOŁAĆ TKANKOWO-SPECYFICZNĄ EKSPRESJĘ GENU W ORGANIZMIE MUSZKI OWOCOWEJ (*DROSOPHILA MELANOGASTER*)

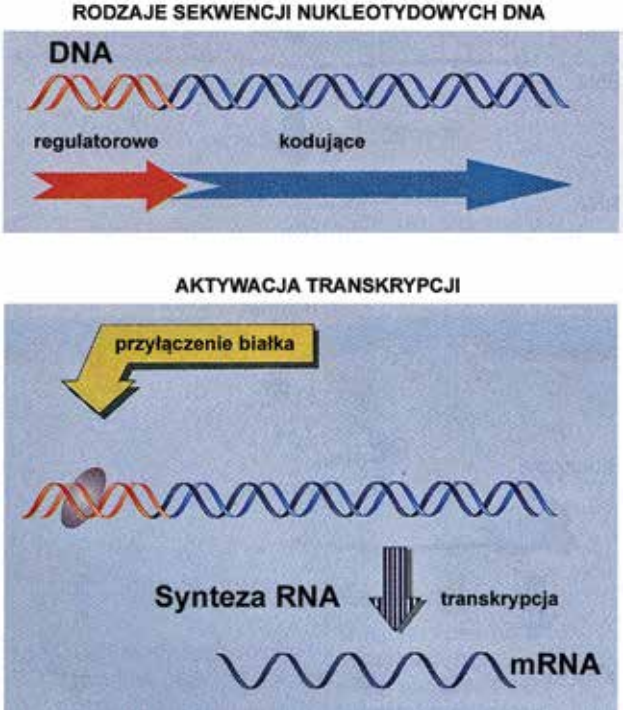
Jolanta Górska-Andrzejak (Kraków)

System GAL4/UAS jest metodą genetyczną, w której wykorzystuje się pochodzące z genomu drożdży (*Saccharomyces cerevisiae*) sekwencje *GAL4* i UAS do wywołania w organizmie muszki owocowej ukierunkowanej ekspresji wybranego genu. Przez ukierunkowanie ekspresji genu (ang. *targeted gene expression*) rozumiemy selektywną aktywację jego transkrypcji tylko w pewnym typie komórek lub w ściśle określonym czasie, np. na określonym etapie rozwoju. Metoda ta, opracowana przez Andreę H. Brand i Norberta Perrimona w 1993 roku (*Brand i Perrimon, 1993. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. Development 118, 401–415*), stała się jedną z ważniejszych metod badawczych stosowanych, gdy celem badań jest poznanie funkcji genu *in vivo* (*łac*. wewnątrz żywego organizmu).

Fakt, że w organizmie muszki owocowej możliwe jest wywołanie tkankowo-specyficznej ekspresji genów, bardzo przyczynił się do zwiększenia popularności tego owada jako organizmu modelowego w badaniach biologicznych.

Działanie sekwencji *GAL4* i UAS w komórkach drożdży

W skład DNA wchodzą dwa rodzaje sekwencji nukleotydowych (Ryc. 1). Są to sekwencje kodujące, które ulegają ekspresji (na ich matrycy, w procesie transkrypcji jest syntetyzowany RNA, a następnie na matrycy RNA w procesie translacji jest syntetyzowane białko) oraz sekwencje regulatorowe, które nie ulegają ekspresji, lecz kontrolują ekspresję sekwencji kodujących. Synteza RNA zachodzi tylko wtedy, gdy do sekwencji regulatorowych przyłączą się określone białka (Ryc. 1).



Ryc. 1. Rodzaje sekwencji nukleotydowych DNA oraz aktywacja transkrypcji sekwencji kodujących. Sekwencja DNA regulatorowego zawiera obszar wiążący dla białek (czynników transkrypcyjnych) regulujących proces transkrypcji. Na skutek aktywacji transkrypcji powstaje mRNA, czyli matrycowy RNA (zmienione za *Genes VII, B. Lewin; Oxford University Press, 2000*).

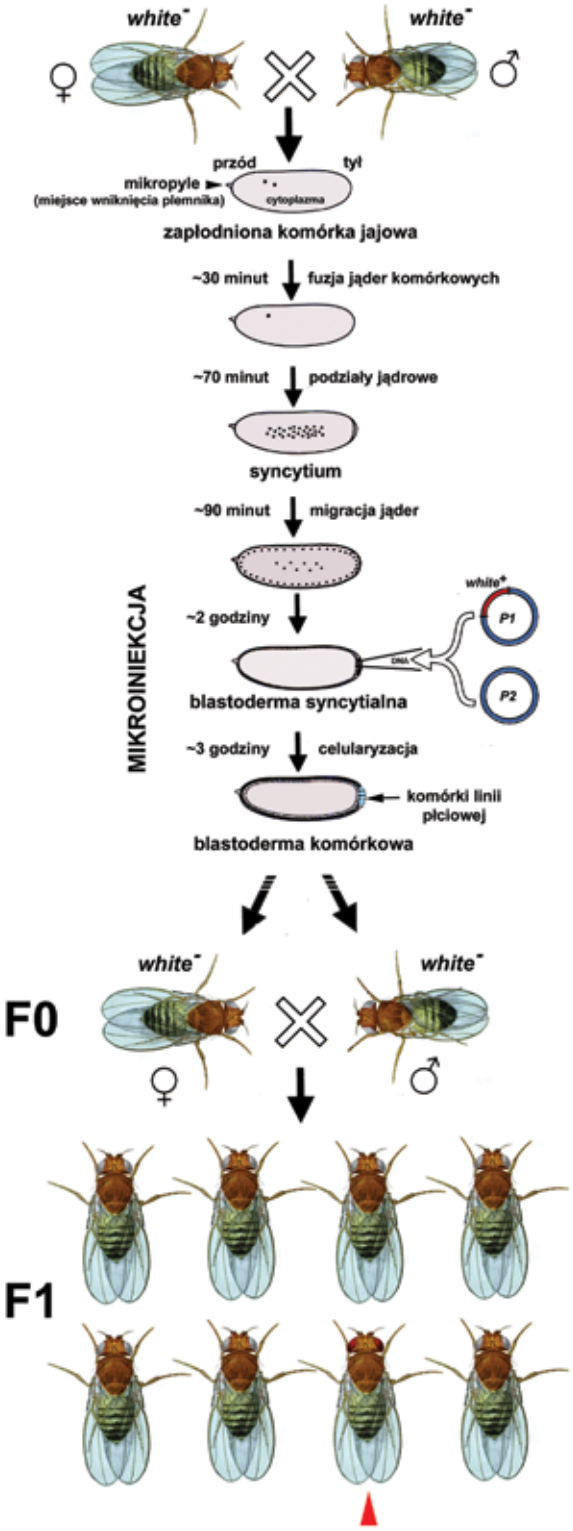
W genomie drożdży, sekwencje *GAL4* i UAS są częścią układu regulującego katabolizm (rozkład) galaktozy, przy czym *GAL4* jest sekwencją kodującą, natomiast UAS sekwencją regulatorową. *GAL4* koduje białko (GAL4) będące klasycznym aktywatorem procesu transkrypcji, co oznacza, że przyłącza się w jądrze komórkowym do odpowiednich sekwencji nukleotydowych DNA regulatorowego i aktywuje transkrypcję określonych genów. Sekwencją regulatorową, do której przyłącza się GAL4 jest właśnie sekwencja UAS (ang. *Upstream Activating Sequence*), natomiast genami, których transkrypcję aktywuje, są geny kodujące enzymy zaangażowane w rozkład galaktozy (np. *GAL1*, *GAL10*). Aktywujące działanie GAL4, a w konsekwencji transkrypcja genów takich jak *GAL1* czy *GAL10*, mogą być jednak zahamowane. Dzieje się tak wtedy, gdy do białka tego przyłączy się produkt innego genu – genu *GAL80*.

Ostatecznie to, czy dojdzie do transkrypcji genów kodujących enzymy rozkładające galaktozę zależy od jej obecności w środowisku. Galaktoza jest induktorem całego systemu. W jej obecności GAL80 nie może wiązać się do GAL4, dzięki czemu GAL4 aktywuje transkrypcję genów kodujących enzymy przeprowadzające jej rozkład. Z kolei brak galaktozy umożliwia powstawanie kompleksów GAL80 - GAL4 i skutkuje zahamowaniem transkrypcji tych genów. Dzięki regulacji ekspresji genów na poziomie transkrypcji, enzymy przeprowadzające rozkład galaktozy są obecne w komórkach drożdży tylko wówczas, gdy jest ona w komórce obecna, a więc gdy są komórce rzeczywiście potrzebne.

Jak działa system GAL4/UAS u *Drosophila*?

Działanie systemu GAL4/UAS u muszki owocowej polega na tym, że drożdżowe białko GAL4 jest wykorzystywane do aktywacji interesującego nas genu (nad którego funkcją prowadzone są badania) w określonym typie komórek muszki lub na określonym etapie rozwoju tego owada. Wcześniej jednak gen ten musi być wyodrębniony, sklonowany (powielony) i wstawiony za sekwencją UAS, czyli umieszczony pod jej kontrolą. Tylko gen przez tę sekwencję kontrolowany, staje się genem docelowym (ang. *target gene*) dla GAL4 i może być przez to białko aktywowany. Kluczowym jest tu fakt, że w genomie *D. melanogaster* nie występuje endogenna sekwencja, która byłaby podobna do sekwencji UAS u drożdży. Dzięki temu, w komórkach muszki, GAL4 aktywuje wyłącznie transkrypcję badanego (wstawionego za UAS) genu.

Aby jednak system GAL4/UAS mógł działać w komórkach muszki, należy najpierw wprowadzić



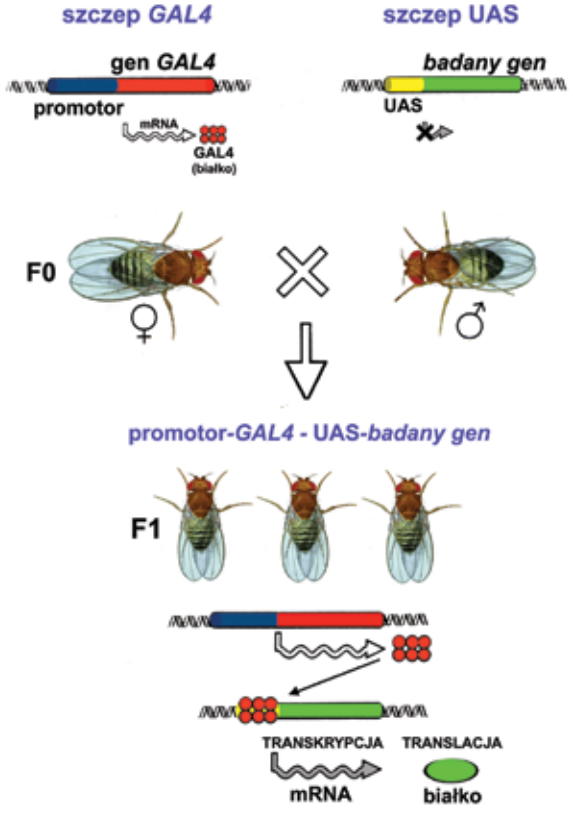
Ryc. 2. Procedura transformacji *Drosophila*. W czasie pierwszych 2–2,5 godzin od zapłodnienia komórki jajowej muszki owocowej, jądro zygoty przechodzi kolejne podziały mitotyczne. Podziałom tym nie towarzyszą podziały cytoplazmy, a więc jajo staje się komórką wielojądrową (**syncytium**) zawierającą około 6000 jąder potomnych. Jądra te początkowo znajdują się w środkowej części cytoplazmy jaja, jednak wkrótce migrują ku powierzchni, gdzie układają się w jedną warstwę tworząc tak zwaną **blastodermę syncytialną**. Na tym etapie rozwoju embrionalnego (tj. między 2 a 3 godziną) jest wprowadzany wektor, element P zawierający wstawiany materiał genetyczny, przy czym jest on wprowadzany do embrionu *Drosophila* w plazmidzie (***P1***). Plazmid to bakteryjna

cząsteczka DNA, która występuje poza chromosomem i ulega replikacji niezależnie od chromosomowego DNA. Wprowadzenie elementu P w plazmid umożliwia jego modyfikowanie tj. wstawianie do niego różnych genów, a następnie namnażanie w komórkach bakterii. Plazmid wraz z elementem P wprowadza się poprzez mikroiniekcję do tylnej części jaja, gdyż tam dochodzi do wyodrębnienia się grupy komórek linii płciowej zarodka. Ponieważ charakterystyczne dla elementu P, niekontrolowane przemieszczanie się w genomie mogłoby zaburzyć stabilność materiału genetycznego komórek płciowych, proces transformacji przeprowadza się w taki sposób, aby po wbudowaniu się w genom muszki, element P wraz z transgenem (wstawionym genem) nie mógł się już przemieszczać. Aby to osiągnąć, transformację przeprowadza się za pomocą dwóch plazmidów (***P1*** i ***P2***). Pierwszy z nich to plazmid, który zawiera sekwencję elementu P wraz ze wstawionym w niego genem (ang. *carrier P element*; ***P1***), ale bez genu kodującego transpozazę, przez co nie jest on w stanie zintegrować się z genomem muszki. Drugi, to pomocniczy plazmid bakteryjny niosący gen transpozazy (ang. *helper*; ***P2***). Plazmid ten ulega ekspresji (na matrycy DNA znajdującego się w nim genu komórka syntetyzuje enzym transpozazę), ale wkrótce się gubi, ponieważ nie może się wbudować w chromosom. Do ***P1*** wstawia się także tzw. gen markerowy, który wywołuje zmiany fenotypowe znakujące osobniki, u których proces transformacji powiódł się. Gdy transformuje się szczep muszek o białych oczach (homozygoty pod względem zmutowanego genu ***white-***), genem markerowym może być gen ***white+*** (czerwone oko – dziki fenotyp). Czerwone oko jest cechą dominująca nad białym okiem, a więc osobniki, u których element P zintegrował się z genomem mają czerwone oczy (czerwona strzałka). W tym przypadku selekcja muszek niosących transgen może być dokonana na podstawie barwy oczu.

konstrukty genetyczne zawierające drożdżowe sekwencje *GAL4* i UAS (wraz z sekwencją badanego genu) do genomu tego organizmu, czyli przeprowadzić genetyczną transformację muszek. Wektorem umożliwiającym wprowadzenie tego materiału genetycznego jest pochodzący z *D. melanogaster* transpozon zwany elementem P (ang. *P-element*). Jest to krótki odcinek DNA, który może zmieniać swoją pozycję w genomie komórek linii płciowej. W obecności enzymu transpozazy może wyskoczyć z danego miejsca i wbudować się niemal w każdym miejscu chromosomu (transpozycja). W transpozon ten wprowadza się metodami inżynierii genetycznej określony materiał genetyczny, w tym przypadku sekwencje z genomu drożdży, aby za pośrednictwem transpozonu włączyły się w genom muszki. W wyniku przeprowadzonej transformacji (ang. *P-element mediated transformation*, Ryc. 2) otrzymuje się szczepy muszek transgenicznych.

Wprowadzając do genomu muszek drożdżowe sekwencje *GAL4* i UAS, zazwyczaj umieszcza się je oddzielnie, tworząc dwa różne szczepy muszek pokolenia rodzicielskiego (Ryc. 3). Jeden z nich zawiera sekwencję kodującą *GAL4* (szczep *GAL4*), natomiast drugi – regulatorową sekwencję UAS (szczep UAS). W tym pierwszym, sekwencja kodująca *GAL4* jest umieszczana pod kontrolą określonego DNA regulatorowego muszki, czyli określonego promotora (promotor-*GAL4*). Promotor ten pełni bardzo ważną rolę. Jeżeli chcemy badać funkcję danego genu w określonym typie komórek lub tkanek, wówczas sekwencja *GAL4* musi być kontrolowana przez promotor kierujący jej ekspresję właśnie do tego typu komórek lub tkanek. Z kolei w szczepie UAS, za sekwencją UAS znajduje się sekwencja kodująca badany gen, który jest genem docelowym dla GAL4 (UAS-*badany gen/gen docelowy dla* GAL4). A zatem, miejsce ekspresji badanego genu jest determinowane przez miejsce ekspresji *GAL4*, a to z kolei kontroluje odpowiedni promotor.

W przypadku, gdy poszczególne elementy systemu *GAL4*/UAS są rozdzielone między dwoma szczepami muszek, osobniki wykazujące ukierunkowaną ekspresję badanego genu uzyskuje się dopiero po skrzyżowaniu ze sobą samca i samicy z tych dwóch szczepów (Ryc. 3). Dopiero w genomie ich potomstwa (F1) znajdują się wszystkie sekwencje potrzebne do jego mobilizacji. System GAL4/UAS nie działa w pokoleniu rodzicielskim (F0), gdyż u tych osobników nie jest kompletny. W szczepach typu UAS, gen docelowy pozostaje w uśpieniu z powodu braku aktywatora jego transkrypcji, czyli białka GAL4. Z kolei w szczepach *GAL4*, aktywator jest wprawdzie w niektórych komórkach obecny, ale nawet w nich nie może aktywować ekspresji żadnego genu, gdyż w genomie tych muszek brak jest sekwencji UAS (Ryc. 3).



Ryc. 3. Zasada krzyżowania szczepów transgenicznych *Drosophila melanogaster* w systemie GAL4/UAS.

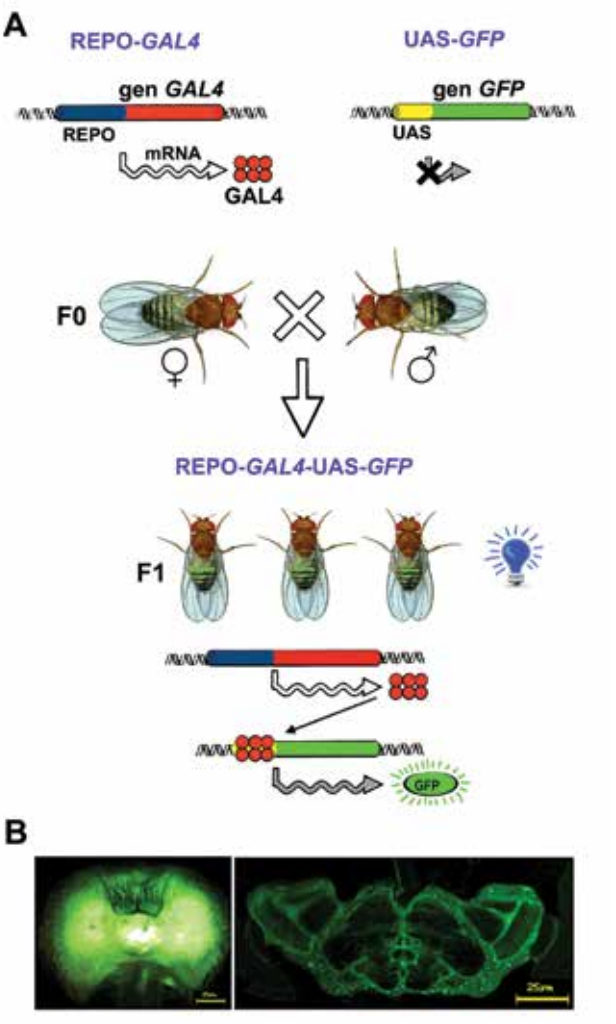
Jaki sens ma umieszczanie w osobnych liniach transgenicznych genu *GAL4* i kontrolowanego przez UAS genu docelowego dla GAL4? Rozwiązanie to

jest korzystne z praktycznego punktu widzenia. Będąc w posiadaniu odpowiednio dużej kolekcji szczepów muszek transgenicznych można szybko uzyskać (przez krzyżowanie, a nie transformację) osobniki, u których badany gen jest aktywowany w różnych typach tkanek lub komórek. W tym celu krzyżuje się muszki linii UAS-*badany gen* z muszkami różnych linii *GAL4*. W każdej z nich gen *GAL4* powinien znajdować się pod kontrolą innych sekwencji regulatorowych (promotorów różnych genów), przez co jego wzór ekspresji w organizmie będzie specyficzny dla genu, od którego pochodzi promotor.

Generowanie szczepów muszek transgenicznych o różnym wzorze ekspresji *GAL4* umożliwia technika *enhancer—trap* (z angielskiego). Aby wyjaśnić jej działanie należy przypomnieć, że transkrypcja większości genów eukariotycznych organizmów wielokomórkowych wymaga współdziałania dwóch rodzajów sekwencji regulatorowych DNA. Są to wspomniane wcześniej sekwencje promotorów, czyli odcinków DNA leżących zazwyczaj powyżej sekwencji kodujących oraz sekwencje enhancerów, czyli wzmacniaczy. Sekwencje wzmacniające transkrypcję, w przeciwieństwie do promotorów mogą być położone w znacznej odległości od danego genu, nawet kilka tysięcy par zasad powyżej lub poniżej jego sekwencji. Ważną ich cechą jest to, że funkcjonują tylko w określonych typach komórek (liniach komórkowych). Generowanie różnych szczepów *GAL4* w metodzie *enhancer—trap* polega więc na tym, że sekwencja kodująca *GAL4* jest wprowadzana do genomu muszki bez sekwencji regulatorowej. Ponieważ wektor niosący *GAL4* integruje się z genomem muszki owocowej w przypadkowej lokalizacji, transkrypcja tej sekwencji będzie kontrolowana przez przypadkowy, leżący w pobliżu miejsca jej wstawienia promotor i enhancer.

Technikę generowania różnorodnych linii *GAL4*, czyli technikę *enhancer—trap* stosuje się na wielką skalę. Dzięki niej cały czas są generowane i opisywane nowe szczepy muszek transgenicznych, które charakteryzuje komórkowo-specyficzny wzór ekspresji *GAL4*. Tego typu badania prowadzone są na przykład w ośrodku badawczym Instytutu Medycznego im. Howarda Hughes (Howard Hughes Medical Institute), w Janelia Farm Research Campus, w USA. Realizowany tam projekt badawczy zakłada generowanie i charakterystykę bardzo dużej liczby różnorodnych szczepów *GAL4,* dzięki którym można będzie badać funkcję interesującego nas genu *in vivo,* w różnych typach komórek.

Oddzielenie od siebie w osobnych szczepach transgenicznych badanego genu (genu docelowego dla GAL4) i genu kodującego GAL4 jest rozwiązaniem korzystnym, także ze względu na lepszą kondycję i żywotność muszek transgenicznych pokolenia rodzicielskiego. Ponieważ tylko w pokoleniu F1 obecne są wszystkie elementy potrzebne do uaktywnienia systemu GAL4/UAS, tylko w F1 uwidacznia się fenotyp ukierunkowanej ekspresji genu, wraz ze wszystkimi tego konsekwencjami. Niekiedy jest to śmierć organizmu (efekt letalny).



Ryc. 4. Schemat krzyżowania szczepów rodzicielskich (F0), gdy celem krzyżówki jest wyznakowanie za pomocą reporterowego GFP (gen docelowy dla GAL4) komórek glejowych układu nerwowego. **A**: Pokolenie F0 to dziewicze samice, u których sekwencja kodująca *GAL4* znajduje się pod kontrolą promotora genu REPO (kieruje ekspresję *GAL4* wyłącznie do komórek glejowych; szczep REPO-*GAL4*) oraz samce, u których gen reporterowy *GFP* jest umieszczony pod kontrolą sekwencji regulatorowej UAS (szczep UAS-*GFP*). U pochodzących z takiej krzyżówki osobników pierwszego pokolenia (F1), białko GAL4 obecne jest tylko w komórkach glejowych, a więc tylko w tych komórkach przyłącza się do UAS i aktywuje transkrypcję genu docelowego leżącego za UAS, czyli genu reporterowego *GFP*. **B**: Zdjęcie tylnej części głowy muszki owocowej oświetlonej światłem niebieskim wzbudzającym fluorescencję GFP. Gdy GFP jest obecne we wszystkich komórkach glejowych układu nerwowego, jego fluorescencja jest widoczna nawet przez kutikulę głowy owada (panel lewy). Po wykonaniu cienkiego preparatu mikroskopowego (panel prawy) i wzbudzeniu fluorescencji GFP w mikroskopie konfokalnym widoczny jest mózg *D. melanogaster*. Zielona fluorescencja pokazuje w nim miejsca, w których występują komórki glejowe.

Niektóre z możliwych zastosowań systemu GAL4/UAS

Zastosowanie systemu GAL4/UAS jest bardzo szerokie. Umożliwia on ingerencję w procesy komórkowe pojedynczych komórek lub różnych typów komórek *in vivo*, a także mikroskopową wizualizację badanych typów komórek w organizmie.

Gdy genem docelowym dla GAL4 jest gen reporterowy, taki jak np. gen kodujący białko zielonej fluorescencji (GFP, ang. Green Fluorescent Protein; szczep: UAS-*GFP*), wówczas komórki organizmu transgenicznego, w których doszło do jego ekspresji są widoczne w świetle niebieskim (Ryc. 4). Pod wpływem światła niebieskiego ulega wzbudzeniu zielona fluorescencja obecnego w nich GFP. Jeżeli z muszkami szczepu REPO-*GAL4* (promotor genu REPO kieruje ekspresję *GAL4* do komórek glejowych układu nerwowego) skojarzymy muszki linii UAS- *GFP*, wówczas w układzie nerwowym ich potomstwa – tylko w jego komórkach glejowych, będzie obecne białko GFP. W ten sposób komórki te zostaną specyficznie wyznakowane (Ryc. 4B). Co ciekawe, linię transgeniczną REPO-*GAL4* można krzyżować z różnego rodzaju liniami UAS-*GFP*, które pozwolą skierować ekspresję *GFP* do różnych miejsc w komórce. W przypadku krzyżowania z linią UAS-*S65T-GFP* (cytoplazmatyczna lokalizacja GFP), GFP będzie występować w cytoplazmie komórek glejowych, natomiast w przypadku krzyżówki z linią UAS-*mCD8-GFP* (błonowa lokalizacja GFP), GFP pojawi się w błonie komórkowej komórek glejowych. Gdy linią, z którą skrzyżujemy REPO-*GAL4* będzie linia UAS-*Act.GFP,* wówczas reporterowe GFP uwidoczni cytoszkielet aktynowy gleju, natomiast w przypadku linii UAS-*mito.GFP* (GFP z sygnałem lokalizacji mitochondrialnej), zielona fluorescencja GFP wyznakuje mitochondria komórek glejowych.

Połączenie systemu GAL4/UAS z wyciszającą ekspresję genów interferencją RNA (iRNA), umożliwia wyciszenie ekspresji wybranego genu *in vivo*, w danym typie komórki czy tkanki, za pomocą małych, interferujących cząsteczek RNA (siRNA). Aby to osiągnąć wystarczy skrzyżować z odpowiednią linią *GAL4* (zapewniającą tkankowo-specyficzne działanie całego systemu) linię UAS-*iRNA*, która jest nośnikiem siRNA dla tego genu. Na przykład, u muszek transgenicznych REPO-*GAL4* – UAS-*iRNA badanego genu* ekspresja interesującego nas genu będzie wyciszona tylko w komórkach glejowych układu nerwowego. Kontrolujący transkrypcję *GAL4* promotor genu REPO zmobilizuje system *GAL4*/UAS tylko w komórkach glejowych, natomiast *iRNA badanego genu* dokona w nich wyciszenia ekspresji tylko tego genu.

Oczywiście, aby generowanie określonych fenotypów komórkowych było jedynie prostą krzyżówką genetyczną, wyjściowe szczepy transgeniczne typu *GAL4* i UAS muszą być ogólnie dostępne. Tak przeważnie się dzieje. Dzięki wspaniałomyślności wielu laboratoriów, głównie genetycznych, wyprowadzone przez nie szczepy są przekazywane do banków szczepów, gdzie są przechowywane i za niewielką opłatą udostępniane badaczom na całym świecie. W Bloomington Drosophila Stock Center (http://flystocks.bio.indiana.edu/) można kupić różnorodne linie transgeniczne typu *GAL4* i UAS. Lista tych linii jest zamieszczona w katalogu „Common Tools", czyli powszechnie stosowanych narzędzi badawczych, gdyż do takich niewątpliwie zalicza się dziś system GAL4/UAS.

Dr Jolanta Górska-Andrzejak jest adiunktem w Zakładzie Biologii i Obrazowania Komórki, Instytutu Zoologii, Uniwersytetu Jagiellońskiego. E-mail: j.gorska-andrzejak@uj.edu.pl.

Pył księżycowy i jego dziwne własności

Marek S. Żbik (Queensland)

Księżyc fascynował ludzi od zarania dziejów i znalazł swoje miejsce w wielu wierzeniach, podaniach i opowieściach. Jeszcze nie tak dawno temu snuto spekulacje na temat natury powierzchni księżyca, jak również o tym, co kryje się po drugiej niewidocznej z Ziemi stronie srebrnego globu.

Pierwsze naukowo sprecyzowane dane na temat natury powierzchni księżyca pojawiły się jeszcze przed początkiem ery kosmicznej. Oto w 1948 roku w biuletynie holenderskiego instytutu astronomicznego pojawił się artykuł (Wesselink 1948) gdzie w oparciu o pomiary fizyczne udowodniono, że na powierzchni księżyca występuje warstwa luźnego materiału okruchowego czyli gruntu. Wesselink przy pomocy teleskopu wrażliwego na zmiany temperatury badał reakcję termiczną gruntu księżycowego