

JOLANTA GÓRSKA-ANDRZEJAK, DANIEL BAJOREK

Zakład Biologii i Obrazowania Komórki
Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych
Uniwersytet Jagielloński
Gronostajowa 9, 30-387 Kraków
E-mail: j.gorska-andrzejak@uj.edu.pl
daniel.bajorek@student.uj.edu.pl

Drosophila melanogaster – PROSTY I ZASKAKUJĄCO SKUTECZNY MODEL W BADANIACH NAD OKOŁODOBOWĄ RYTMIKĄ ORGANIZMU I MOLEKULARNYM MECHANIZMEM ZEGARA BIOLOGICZNEGO NIE TYLKO U OWADÓW

Drosophila melanogaster JAKO MODEL BADAWCZY

Wiele badań nad podstawowymi procesami życiowymi prowadzi się obecnie z wykorzystaniem organizmów, które nazywamy modelowymi (GÓRSKA-ANDRZEJAK i współaut. 2016). Wyniki uzyskane w badaniach na takich gatunkach można odnieść również do innych organizmów, w tym do człowieka, ponieważ podstawowe procesy biologiczne są wysoce konserwatywne, tzn. podlegały niewielkim zmianom w toku ewolucji. Jednocześnie prowadzenie eksperymentów na sprawdzonych modelach jest znacznie łatwiejsze. Udogodnienia mogą być różne. Może to być prosta hodowla, krótki cykl życiowy czy wysoka płodność. W badaniach genetycznych pożądaną cechą może być także niewielki genom.

Zalety takie posiada *Drosophila melanogaster*, 2–3 milimetrowej wielkości muchówka, potocznie nazywana muszką owocową (poprawna nazwa gatunkowa to wywilżna karłowata lub wywilżnia). *Drosophila melanogaster* jest owadem o krótkim cyklu rozwojowym, który trwa od 10 do 14 dni i obejmuje tylko 3 stadia larwalne oraz stadium poczwarki. Jedna samica składa do 3 tysięcy jaj. Badania z użyciem muszki owocowej można więc prowadzić szybko i na dużej liczbie osobników, czyli na dużej próbie. Utrzymanie nawet sporej hodowli jest

łatwe, tanie i nie zajmuje dużo miejsca. Krótki cykl rozwojowy umożliwia szybkie uzyskiwanie pokolenia potomnego (np. w wyniku celowego krzyżowania), co sprzyja badaniom genetycznym. Ułatwia je także występowanie w komórkach gruczołów ślinowych larw tzw. chromosomów olbrzymich (politenicznych), które można obserwować za pomocą mikroskopu świetlnego (ROBERTS 2006).

Drosophila melanogaster stała się gatunkiem modelowym na początku XX w. (GÖRLICH i GÓRSKA-ANDRZEJAK 2013), gdy użył jej do swoich badań amerykański biolog i genetyk, Thomas Hunt Morgan (1866–1945), twórca chromosomowej teorii dziedziczności, uhonorowany w 1933 r. Nagrodą Nobla w dziedzinie fizjologii lub medycyny (ROBERTS 2006, HALES i współaut. 2015). Obecnie model ten jest popularny także dlatego, że dziesięciolecia badań z jego wykorzystaniem niezwykle wzbogaciły naszą wiedzę, która w dobie Internetu stała się powszechnie dostępna (np. na stronie FlyBase; <http://flybase.org>). Genom muszki, ~165 milionów par zasad tworzących około 14 tys. genów zlokalizowanych tylko na czterech parach chromosomów, jest znany już od 2000 r. (CELNIKER i RUBIN 2003), a metodyka badań obfituje w liczne narzędzia genetyczne (HALES i współaut. 2015, YAMAGUCHI i YOSHIDA 2018). Oprócz dzikich szczepów muszki owocowej, takich jak np. szczep Canton-S, używamy

Słowa kluczowe: *Drosophila melanogaster*, geny zegarowe, neurony zegarowe, rytmy okołodobowe, system GAL4/UAS, zegar biologiczny, zegary glejowe

Pracę przygotowano z wykorzystaniem środków finansowych Zakładu Biologii i Obrazowania Komórki, Instytutu Zoologii i Badań Biomedycznych UJ (N18/DBS/000015).

dziś w badaniach setki lub nawet tysiące szczepów transgeniczných, które są dostępne w bankach (np. w Bloomington Drosophila Stock Center w Stanach Zjednoczonych; <https://bdsc.indiana.edu>). Proste krzyżówki genetyczne między odpowiednimi szczepami transgenicznymi pozwalają w krótkim czasie uzyskać muszki o zmienionej ekspresji genów w wybranym typie komórek (BRAND i PERRIMON 1993, DUFFY 202). Umożliwia to poznanie funkcji poszczególnych genów i białek *in vivo*, czyli w organizmie.

Oferując tak wiele, muszka owocowa stała się niezwykle popularnym modelem badawczym nie tylko w dziedzinie genetyki, ale też w badaniach ewolucyjnych, toksykologicznych, farmakologicznych oraz w biologii rozwoju i neurobiologii. Nawet badania nad chorobami neurodegeneracyjnymi człowieka z powodzeniem prowadzone są na tym modelu (PANDEY i NICHOLS 2011, YAMAGUCHI i YOSHIDA 2018, BOLUS i współaut. 2020). Wynika to z faktu, że aż 75% genów leżących u podłoża ludzkich schorzeń (takich jak choroba Alzheimera, zespół Downa, autyzm, czy cukrzyca) ma swoje funkcjonalne odpowiedniki w genomie *D. melanogaster* (GIEBUŁTOWICZ 2018).

W artykule przedstawiono rolę muszki owocowej w badaniach nad rytmem okołodobowym i generującym je molekularnym mechanizmem zegara biologicznego (ROSATO i współaut. 2006). O randze tych badań najlepiej świadczy fakt, że w 2017 r. przyznano Nagrodę Nobla w dziedzinie fizjologii lub medycyny trzem badaczom, którzy pracując na *D. melanogaster*, odkryli genetyczne i molekularne podłoże rytmiki okołodobowej. Byli nimi Jeffrey C. Hall, Michael Rosbash i Michael W. Young (GIEBUŁTOWICZ 2018).

RYTMY OKOŁODOBOWE

Rytmy okołodobowe (ang. circadian, łac. *circa*-około, *dies*-dzień), to oscylacje różnych procesów biologicznych o około 24-godzinny okresie. Są one adaptacją do zachodzących w cyklu dobowym zmian środowiskowych (przede wszystkim do dnia i nocy), wynikających z ruchu obrotowego Ziemi wokół własnej osi. Jest zrozumiałe, że dobowy rytmik organizmu zamieszkującego zmienne środowisko jest synchronizowana z tymi zmianami. Informacji o porze doby dostarcza wtedy światło, temperatura czy inne czynniki środowiska, które podlegając cyklicznym zmianom dobowym (np. następstwo dnia i nocy, wzrost temperatury w dzień i jej spadek w nocy), pełnią rolę tzw. dawców czasu (niem. Zeitgeber, ang. time givers). Jednak dobowe oscylacje procesów biologicznych utrzymują się także w stałych warunkach laboratoryjnych, tj. w warun-

kach pozbawionych informacji od dawcy(ów) czasu, np. w stałej ciemności. Okres ich rytmu, czyli czas trwania pełnego cyklu, wynosi wtedy około 24-godzinny.

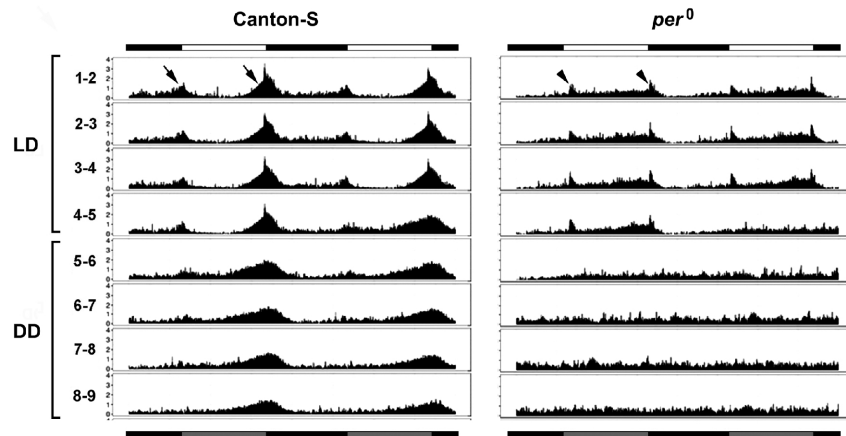
Skoro rytmika organizmu nie zanika w stałych warunkach laboratoryjnych, to nie jest ona jedynie bezpośrednią odpowiedzią na dobowe zmiany środowiskowe, lecz ma charakter endogennej – jest generowana przez wewnętrzny mechanizm zegarowy. Przejawy działania tego mechanizmu, czyli rytmiczność różnych procesów biologicznych, obserwowano od wieków, ale jego budowę molekularną (molekularne podłoże rytmiki) zaczęto poznawać i rozumieć dopiero w latach 60. XX w., właśnie dzięki badaniom na *D. melanogaster* (ROSATO i współaut. 2006, GIEBUŁTOWICZ 2018).

TESTY BEHAVIORALNE SPRAWDZAJĄCE DZIAŁANIE MECHANIZMU ZEGAROWEGO *D. melanogaster*

Jak u innych owadów, okołodobowy rytmik jest widoczny w wielu procesach życiowych muszki owocowej (BEBAS 2010), jednak to dwa rytmy: wyjścia *imago* (owada dorosłego) z poczwarki i aktywności lokomotorycznej, stały się rytmemi testowymi, dzięki którym sprawdzano działanie mechanizmu zegarowego podczas badań nad jego podłożem genetycznym i molekularnym. Zachowania te charakteryzują się tak silną rytmiką okołodobową, że można je porównać do „wskazówek” pokazujących jak „chodzi” zegar *D. melanogaster* (CHIU i współaut. 2010, MARK i współaut. 2021).

Ponieważ dorosły owad opuszcza poczwarkę tylko raz w życiu, to rytmikę tego zjawiska można zaobserwować jedynie w populacji (rytm populacyjny). Monitorując grupę muszek szczepu dzikiego Canton-S, w tym samym lub podobnym wieku, można zauważyć, że najwięcej owadów opuszcza poczwarkę we wczesnych godzinach rannych. Każdego poranka obserwuje się więc wyraźne nasilenie tego zjawiska, co wskazuje na prawidłowe działanie zegara biologicznego badanej populacji.

Jeszcze lepszym i obecnie najczęściej stosowanym testem behawioralnym sprawdzającym działanie zegara *D. melanogaster* jest badanie rytmiki jej aktywności lokomotorycznej (ruchowej). Jak pokazuje zamieszczony na Ryc. 1 kilkunastodniowy zapis lokomotoryki (aktogram) szczepu dzikiego Canton-S, gdy muszki hodowane są w warunkach 12-godzinnej doby i 12-godzinnej nocy (LD 12:12; ang. light/dark), wzorzec ich aktywności ruchowej jest bimodalny (ROSATO i KYRIACOU 2006, CHIU i współaut. 2010). Widoczne są w nim dwa szczyty aktywności: poranny i wieczorny. Co ważne, nasilenie aktywności zarówno porannej, jak i wieczornej następuje stopniowo i rozpoczyna się jeszcze



Ryc. 1. Typowy wzorec aktywności lokomotorycznej (aktogram) muszek szczepu dzikiego Canton-S i arytmicznych mutantów zegara biologicznego *per*⁰. Rycina przedstawia podwójne aktogramy (po dwie doby w jednej linii, przy czym druga doba jest powtórzona także w kolejnej linii, ang. double plotted) obrazujące zapis 9-dniowej rejestracji aktywności lokomotorycznej za pomocą Drosophila Activity Monitoring System (DAMS, Trikinetics). Rejestrację aktywności prowadzono według typowego schematu: najpierw w zmiennych warunkach środowiska, tj. w warunkach dnia i nocy, LD (ang. light/dark conditions), które synchronizują pracę zegara z rytmem zmian środowiskowych, a następnie w stałych warunkach, tj. w stałej ciemności, DD (ang. dark/dark conditions), które ukazują naturalne tempo pracy mechanizmu zegarowego. Strzałki wskazują fazę antycypacji w LD i utrzymujący się wieczorny szczyt aktywności muszek Canton-S w DD, co świadczy o prawidłowym działaniu ich mechanizmu zegarowego. Elementów tych nie widać natomiast w aktogramie arytmicznego mutantu *per*⁰. Niewielkie szczyty w LD (groty strzałek) są tylko krótką, bezpośrednią reakcją mutantów na zmianę warunków świetlnych (ang. startling effect). Nie widać w nich fazy antycypacji. W DD brak jakichkolwiek szczytów.

przed zmianą warunków świetlnych, tj. przed włączeniem światła rano i przed zgaszeniem wieczorem (Ryc. 1). Oznacza to, że owady przewidują nadchodzące zmiany i zaczynają się do nich przygotowywać z wyprzedzeniem, gdyż ich zegar biologiczny działa prawidłowo i mierzy czas (ROSATO i KYRIACOU 2006).

Choć zegar nieustannie synchronizuje tempo swojej pracy z rytmem zmian środowiskowych, które wyznaczają upływ czasu, to jak już wspomniano, działa także wtedy, gdy organizm jest pozbawiony informacji od dawcy czasu. Jest to widoczne w tej części aktogramu (Ryc. 1), która pokazuje rytmikę aktywności lokomotorycznej muszek Canton-S trzymany w stałej ciemności (DD). Wyraźnie wyróżnia się rytm endogenne, swobodnie biegnący (ang. free-running rhythm), który odzwierciedla naturalne tempo pracy mechanizmu zegarowego, podtrzymującego rytmikę aktywności owadów w takim środowisku. Jak widać na aktogramie, poranny szczyt aktywności zanika w warunkach DD, natomiast wieczorny utrzymuje się, występując co 23,8 godziny.

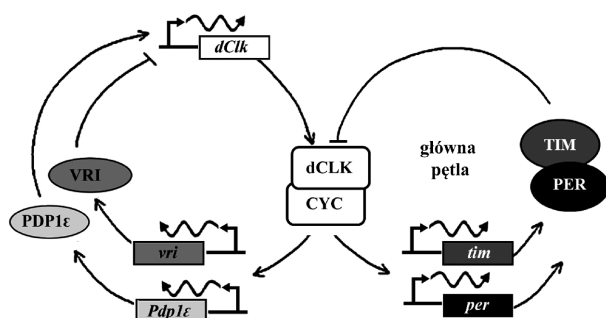
BADANIA NAD MECHANIZMEM OSCYLATORA MOLEKULARNEGO *D. melanogaster* – RYS HISTORYCZNY

Badania nad genetycznym i molekularnym podłożem okołodobowej rytmiki rozpoczęły

prace KONOPKI i BENZERA (1971). Odkryli oni gen kluczowy dla prawidłowej rytmiki wychodzenia muszek z poczwerek. Konopka znalazł w populacji *D. melanogaster* grupę arytmicznych mutantów i dwie grupy mutantów o zmienionym okresie rytmu: skróconym do ok. 19 godzin i wydłużonym do ok. 29 godzin. Jak się okazało, we wszystkich trzech grupach mutacji uległ ten sam gen, który został nazwany przez Konopkę *period* (*per*), a mutanty odpowiednio: *per*⁰, *per*^s (short) i *per*^l (long). Odkrycie genu *per* było pierwszym krokiem na drodze do zrozumienia molekularnego mechanizmu zegarowego, chociaż sekwencja i funkcja *per* pozostawały nieznane aż do lat 80. XX w. Gdy wreszcie gen ten zmapowano i sklonowano, dwa niezależne zespoły badawcze wykazały, że wprowadzenie jego (*per*) fragmentów do genomu arytmicznych mutantów *per*⁰ (ang. rescue experiment) przywraca zarówno rytmikę wychodzenia z poczwerek, jak i rytmikę aktywności lokomotorycznej (BARGIELLO i współaut. 1984, REDDY i współaut. 1984, ZEHRING i współaut. 1984).

Przez długi czas *per* był jedynym, znanym genem zegarowym. Dopiero szybki postęp w badaniach nad zegarem w latach 90. XX w. doprowadził do znalezienia jeszcze innych mutantów *D. melanogaster* o zaburzonej funkcji zegara i identyfikacji kolejnych genów zegarowych: genu *timeless* (*tim*) (SEHGAL i współaut. 1994),

a także genów *Clock* (*Clk*; ALLADA i współaut. 1998) i *cycle*, (*cyc*) (RUTILA i współaut. 1998). Dwa ostatnie okazały się kodować czynniki (białka) pozytywnie regulujące transkrypcję genów *per* i *tim* (a zatem będące aktywatorami tych procesów). W ten sposób poznano kluczowe elementy budujące główną pętlę mechanizmu zegarowego muszki owocowej (Ryc. 2). Co ciekawe, gen *Clk* został najpierw odkryty jako część mechanizmu zegarowego ssaków (VITATERNA i współaut. 1994), co przyspieszyło dalsze badania na tym polu i pokazało, że mechanizm zegarowy jest konserwatywny (YU i HARDIN 2006).



Ryc. 2. Molekularny mechanizm zegara biologicznego. Nazwy genów pisane są pismem pochyłym (np. *per*), nazwy białek pismem prostym i wielkimi literami (np. PER). Strzałki oznaczają aktywację, natomiast „T” oddziaływania hamujące.

Pod koniec lat 90. XX w. i na początku 2000 r. zidentyfikowano dalsze elementy mechanizmu zegarowego *D. melanogaster*: fotoreceptor komórkowy, *cryptochrom* (*cry*) (EMERY i współaut. 1998, STANEWSKY i współaut. 1998) i dwie kinazy, *double-time* (*dbt*) (KLOSS i współaut. 1998, PRICE i współaut. 1998) oraz *shaggy* (*sgg*) (MARTINEK i współaut. 2001), a także *vri* (*vri*) – represor transkrypcji zaangażowany w funkcjonowanie drugiej pętli mechanizmu zegarowego (BLAU i YOUNG 1999).

DZIAŁANIE MECHANIZMU OSCYLATORA MOLEKULARNEGO *D. melanogaster*

Badania nad ekspresją *per* wykazały, że mRNA *per* i białko PER ulegają cyklicznej, dobowej ekspresji, przy czym wzrost poziomu białka jest skorelowany z obniżeniem poziomu jego transkryptu w komórce. Wyniki te sugerowały, że białko PER negatywnie reguluje transkrypcję swojego własnego genu (SIWICKI i współaut. 1988, HARDIN i współaut. 1990). Badania nad odkrytym w drugiej kolejności genem zegara, *tim*, potwierdziły trafność tej hipotezy. Pokazały, że dobowe oscylacje mRNA *per* i *tim* są zgodne w fazie, a białka PER i TIM

wchodzą ze sobą w kontakt, i hamują transkrypcję własnych genów (GEKAKIS i współaut. 1995, SEHGAL i współaut. 1995). Powstała w ten sposób pętla ujemnego sprzężenia zwrotnego stanowi podstawę molekularnego mechanizmu zegarowego *D. melanogaster* (Ryc. 2). Jej prawidłowe funkcjonowanie, tj. generowanie dynamicznych, dobowych oscylacji w poziomie transkryptów *per* i *tim*, wymaga jednak aktywności jeszcze wielu innych białek.

Poziom mRNA *per* i *tim* wzrasta w ciągu dnia. Wczesnym wieczorem, gdy osiąga maksimum, w cytoplazmie komórek zaczynają się akumulować białka PER i TIM, syntetyzowane na matrycy tego RNA. W połowie nocy, PER i TIM gromadzą się już w jądrze komórkowym, ponieważ TIM stabilizuje PER i indukuje jego transport z cytoplazmy do jądra (ZHENG i SEHGAL 2012). Jądrowa akumulacja PER i TIM zbiega się w czasie z obniżeniem poziomu mRNA *per* i *tim* (na skutek działania wspomnianego wcześniej ujemnego sprzężenia zwrotnego), przy czym PER i TIM nie hamują transkrypcji swoich własnych genów bezpośrednio, gdyż nie posiadają domen, które umożliwiłyby im wiązanie się z DNA. Wpływają natomiast na heterodimery białek CLOCK (CLK) i CYCLE (CYC), które są aktywatorami transkrypcji genów *per* i *tim* po przyłączeniu się do sekwencji regulatorowej E-box w obrębie promotorów tych genów. Dane biochemiczne wskazują na to, że w wyniku działania PER, które rekrutuje kinazę DOUBLETIME (DBT) w celu fosforylacji CLK, dochodzi do sekwestracji kompleksu CLK-CYC (KIM i EDERY 2006, KIM i współaut. 2007). Rola TIM w negatywnym sprzężeniu zwrotnym jest mniej jasna niż rola PER, ale wiadomo, że wczesnym rankiem poziom TIM gwałtownie spada na skutek jego degradacji, która jest inicjowana przez światło. Degradacja TIM zachodzi za pośrednictwem wspomnianego wcześniej fotoreceptora CRY (EMERY i współaut. 1998, STANEWSKY i współaut. 1998). Po aktywacji światłem, łączy się on z TIM, co prowadzi do degradacji TIM (mechanizm zegarowy jest więc wrażliwy na światło dzięki CRY). Ponieważ TIM stabilizuje PER, to w kilka godzin po zaniku TIM (po południu) spada również poziom PER. Degradacja TIM i PER w ciągu dnia skutkuje zniesieniem negatywnego sprzężenia zwrotnego. To z kolei umożliwia wznowienie transkrypcji genów *per* i *tim*, czyli rozpoczęcie nowego cyklu transkrypcyjnego.

Z główną pętlą ujemnego sprzężenia zwrotnego (ang. core loop) łączy się druga pętla (Ryc. 2), w której aktywatory transkrypcji CLK-CYC również zajmują centralną pozycję. W tym przypadku aktywują one transkrypcję genów: *Par domain protein 1 ε* (*Pdp1ε*) i *vri* (*vri*), które kodują czynniki transkrypcyjne regulujące ekspresję genu *Clk*, przy czym

PDP1 jest aktywatorem, a VRI represorem transkrypcji *Clk*. VRI i PDP1 działają o innej porze doby i utrzymują rytmiczną ekspresję *Clk* mRNA. Uważa się, że druga pętla stabilizuje mechanizm zegarowy i zapewnia precyzję jego działania (CYRAN i współaut. 2003; GLOSSOP i współaut. 2003).

Oprócz tego, w kontrolę transkrypcji zaangażowane są także białka CLOCKWORK ORANGE, KAYAK-a i E75 (KADENER i współaut. 2007, LIM i współaut. 2007, LING i współaut. 2012, KUMAR i współaut. 2014). Dobowe oscylacje poziomu białek, tj. ich obecność i zanikanie o określonej porze doby, jest w dużej mierze kontrolowane także przez potranslacyjne modyfikacje ich cząsteczek. W czasowej regulacji stabilności białka ważną rolę ogrywa np. jego fosforylacja. Zarówno PER, jak i TIM, są cyklicznie fosforylowane. Na przykład fosforylacja PER przez kinazę kazeinową DBT i kinazę kazeinową 2 (CK2) podnosi jego aktywność jako inhibitora transkrypcji (BEBAS 2010).

NEURONY Z AKTYWNYM OSCYLATOREM W MÓZGU *D. melanogaster*

Zegar biologiczny owadów jest systemem składającym się z wielu równorzędnych oscylatorów, które ze sobą współdziałają (BEBAS 2010). Oznacza to, że żaden z nich nie powinien być nazywany głównym zegarem. Jednak mianem tym określa się okołodobowy oscylator, który znajduje się w mózgu *D. melanogaster* i reguluje rytmy behawioralne oraz rozwojowe. Stanowi go około 150 neuronów, które cechuje rytmiczna ekspresja genów zegarowych. Ich ciała komórkowe lokalizowane są w siedmiu grupach po każdej stronie mózgu (GÓRSKA-ANDRZEJAK 2011). Ze względu na położenie w mózgu, względem jego centralnej części, neurony zegarowe określa się mianem grzbietowych (D-dorsal) i bocznych (L-lateral). Wśród neuronów grzbietowych wyróżnia się trzy grupy (DN1, DN2 i DN3), natomiast wśród neuronów bocznych opisano tzw. boczne neurony tylne (ang. lateral posterior neurons, LPNs) i neurony boczne (ang. lateral neurons, LNs). Ponieważ te drugie występują w grzbietowej i brzusznej części mózgu, określa się je mianem grzbietowych neuronów bocznych (ang. dorsal lateral neurons, LNd) i brzusznych neuronów bocznych (ang. ventral lateral neurons, LNV). Wśród brzusznych neuronów bocznych, ze względu na wielkość ciał komórkowych, wyróżnia się dodatkowo neurony małe (małe brzuszne neurony boczne; ang. small ventral lateral neurons, s-LNV) i duże (duże brzuszne neurony boczne; ang. large ventral lateral neurons, l-LNV). We wszystkich grupach neuronów zegara obserwuje się dobowe oscylacje poziomu ekspresji *per* i kilku innych genów zegarowych. Kluczową

rolę w generowaniu rytmów behawioralnych i rytmiki w DD odgrywają jednak neurony grupy s-LNV (HERMANN-LUIBL i HELFRICH-FÖRSTER 2015).

KOMÓRKI GLEJOWE Z AKTYWNYM OSCYLATOREM W MÓZGU *D. melanogaster*

Chociaż pierwsze badania nad lokalizacją białka PER w mózgu *D. melanogaster* wykazały jego obecność nie tylko we wspomnianych grupach neuronów, ale także w niektórych typach gleju (EWER i współaut. 1992), to główny nurt badań przez długi czas skupiał się wyłącznie na poznawaniu roli neuronów zegarowych. Znacznie później zaczęto interesować się komórkami glejowymi z aktywnym oscylatorem (ang. glial clocks) (JACKSON 2011). Odzwierciedlało to typowe podejście, w którym neurony miały „pierwszeństwo” jako komórki pobudliwe, pełniące nadrzędną rolę w układzie nerwowym. Rola komórek glejowych, nawet jako drugorzędna, była bardzo długo niedoceniana i ograniczana wyłącznie do funkcji strukturalnej oraz podporowej.

Badania EWERA i współaut. (1992) wykazały, że ograniczenie ekspresji *per* tylko do komórek glejowych (gdy metodami inżynierii genetycznej wyłączało się jego ekspresję w neuronach) nie znosiło rytmiki aktywności lokomotorycznej owadów. Oznaczało to, że komórki glejowe mogą być generatorami rytmiki behawioralnej, przy czym potrzebują wsparcia ze strony neuronów zegarowych, bo indukowane przez nie oscylacje mają niską amplitudę (ekspresja *per* w neuronach zegarowych warunkowała oscylacje o wyższej amplitudzie). Sugerowało to, że funkcjonowanie oscylatorów w komórkach gleju może być mniej ważne i zależne od neuronów zegarowych, wobec czego są one oscylatorami peryferycznymi i to w dosłownym tego słowa znaczeniu. Dalsze badania potwierdziły, że aktywność oscylatorów glejowych jest modulowana przez neurony. Wykazały jednak także, że chociaż oscylatory glejowe pełnią rolę drugoplanową i znajdują się pod wpływem neuronów zegarowych, to relacje pomiędzy nimi a neuronami zegarowymi są partnerskie, gdyż one także wywierają wpływ na neurony zegarowe.

Zaburzenia rytmiki behawioralnej, tj. rytmiki aktywności lokomotorycznej, obserwowano także u mutantów genu *ebony* (SUH i JACKSON 2007). Gen ten koduje enzym przyłączający -alaninę do amin takich jak histamina, serotonina czy dopamina. Co niezwykle ważne, ulega on ekspresji wyłącznie w komórkach glejowych *D. melanogaster*, a poziom jego białka (EBONY) w gleju wykazuje wyraźną rytmikę dobową z maksimum ekspresji na

początku dnia (SUH i JACKSON 2007). Rytmika ta utrzymuje się także w DD i zanika u mutantów *per⁰* oraz *tim⁰*. Jej endogenny charakter oraz fakt, że wywołanie ekspresji *ebony* w komórkach glejowych mutantów *ebony* przywraca u tych owadów rytmikę aktywności lokomotorycznej (ang. rescue experiment), potwierdzają istotną rolę komórek glejowych syntetyzujących EBONY i samego EBONY w rytmice behawioralnej (SUH i JACKSON 2007, ZYCHAL i GÓRSKA-ANDRZEJAK 2014). Ponadto rolę gleju w rytmice behawioralnej potwierdziły badania wykazujące, że zaburzenie transportu pęcherzykowego, gradientu jonowego błony komórkowej lub sygnalizacji wapniowej tych komórek, również może skutkować brakiem rytmu aktywności lokomotorycznej owadów (NG i współaut. 2011). Co więcej, jeden z typów komórek gleju w neuropilu, nazywany glejem podobnym do astrocytów (ang. astrocyte like glia), wpływa na funkcjonowanie neuronów zegarowych, a więc może modulować pracę centralnego zegara muszki owocowej (NG i współaut. 2011).

Oprócz rytmiki behawioralnej, komórki glejowe regulują także okołodobową plastyczność struktur nerwowych. Glej płatów wzrokowych *D. melanogaster* przejawia plastyczne, okołodobowe zmiany strukturalne i jest zaangażowany w regulację tego typu rytmiki w układzie wzrokowym muszki owocowej (GÓRSKA-ANDRZEJAK 2013). Dobowe i okołodobowe oscylacje PER w tym gleju mają taki sam wzorzec jak w neuronach zegarowych, ale ich amplituda jest znacznie niższa, co może tłumaczyć, dlaczego zegary w gleju są „słabszymi” oscylatorami niż neurony zegarowe. Należy dodać, że oscylatory należące do różnego typu gleju różnią się poziomem ekspresji PER, a więc ich wpływ na rytmikę strukturalną lub behawioralną może być zróżnicowany. Wydaje się też, że działanie tych oscylatorów peryferycznych (jak wspomniano powyżej) jest regulowane przez neurony zegarowe, zwłaszcza przez neurony boczne (LNV), z udziałem syntetyzowanego przez nie neuropeptydu PDF (ang. pigment dispersing factor) (GÓRSKA-ANDRZEJAK i współaut. 2018, KRZEPITOWSKI i współaut. 2018).

Dotyczy to na przykład oscylatorów glejowych znajdujących się w zewnętrznej części drugiego neuropilu wzrokowego (medulla) muszki owocowej (GÓRSKA-ANDRZEJAK i współaut. 2018). Komórki tego gleju leżą w pobliżu zakończeń nerwowych neuronów LNV, z których uwalniany jest PDF i mogą odbierać ten sygnał, ponieważ posiadają odpowiednie receptory (PDFR). Co ciekawe, komórki te wydają się być silniejszymi oscylatorami niż inne typy gleju w układzie wzrokowym *D. melanogaster*, gdyż wyrażają *per* na wyższym poziomie. Jednak u mutantów *pdf⁰*, u których brak jest warun-

kowanej przez PDF sygnalizacji ze strony LNV, amplituda oscylacji PER w tych komórkach może być nawet dwukrotnie większa. Wydaje się więc, że rolą tej sygnalizacji jest kontrolowanie (zmniejszanie) amplitudy oscylacji PER w komórkach glejowych (GÓRSKA-ANDRZEJAK i współaut. 2018).

W mózgu *D. melanogaster* mamy zatem do czynienia ze złożonym systemem zegarowym, zbudowanym z neuronów (zwanych zbiorczo głównym oscylatorem/zegarem) i komórek glejowych (w których są zlokalizowane oscylatory peryferyczne, kontrolowane przez oscylator znajdujący się w neuronach, ale jednocześnie posiadające na tyle dużą autonomię, że mogą regulować oscylator w neuronach), z których pierwsze występują w grupach, a drugie są rozproszone w całym mózgu. Badanie takiego systemu wymaga dogłębnego poznania możliwości działania każdej z jego części oraz ich oddziaływania na siebie – czyli znalezienia odpowiedzi na pytanie, w jaki sposób części te komunikują się ze sobą i jak na siebie wpływają? Choć wiemy już niemało na ten temat (AHMAD i współaut. 2021), to na pewno nie został on w pełni wyczerpany.

Takie badania przeważnie wymagają ingerencji w profil ekspresji genów komórek, które stanowią określoną część systemu zegarowego, a następnie sprawdzenia reakcji pozostałych elementów systemu/organizmu na taką ingerencję. Można np. wyciszyć ekspresję wybranego genu zegarowego, po czym sprawdzić, jak tego typu zmiana wpływa na (dobowy) profil ekspresji innych genów (w tym tych, które są kontrolowane przez zegar, czyli genów cgc; ang. clock controlled genes) oraz na rytmikę aktywności lokomotorycznej owadów.

UKIERUNKOWANA ZMIANA EKSPRESJI GENÓW – SYSTEM GAL4/UAS

Jednym z podstawowych narzędzi genetycznych umożliwiających zmianę ekspresji wybranego genu (ang. target gene) w określonej grupie komórek (ekspresja ukierunkowana) jest system GAL4/UAS (GÓRSKA-ANDRZEJAK 2012).

GAL4 i UAS to odpowiednio czynnik białkowy i sekwencja nukleotydowa, które stanowią część układu regulującego katabolizm galaktozy u drożdży, *Saccharomyces cerevisiae*. GAL4 jest czynnikiem transkrypcyjnym, który przyłącza się do sekwencji regulatorowej UAS (ang. upstream activating sequence), co aktywuje transkrypcję genów znajdujących się pod jej kontrolą. Są to geny, które kodują enzymy rozkładające galaktozę. Ponieważ GAL4 może się przyłączyć do UAS tylko wtedy, gdy w komórce jest obecna galaktoza, to układ ten aktywuje ekspresję enzymów jedynie w warunkach zapotrzebowania.

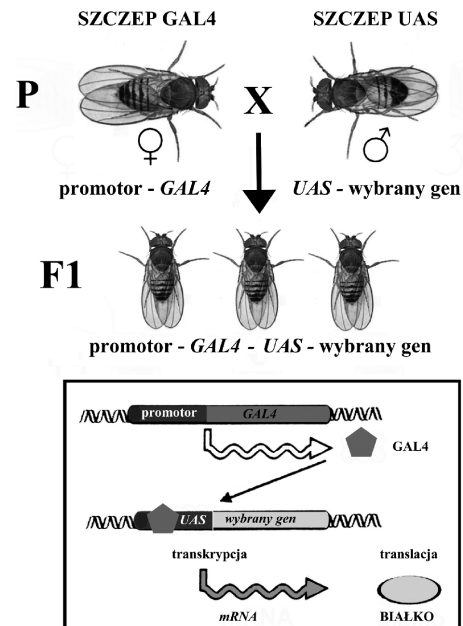
BRAND i PERRIMON (1993) wykazali, że system, wywołujący u drożdży ekspresję enzymów rozkładających galaktozę, można z powodzeniem zastosować do wywoływania ukierunkowanej ekspresji jakiegokolwiek genu u muszki owocowej *in vivo*. Trzeba tylko wprowadzić do jej genomu odpowiednie konstrukty z sekwencjami *GAL4* i *UAS* (w genomie *D. melanogaster* nie ma takich sekwencji).

Zazwyczaj wprowadza się je oddzielnie, uzyskując transgeniczne szczepy, w nazwie których występują skróty *GAL4* i *UAS*. W szczepie *GAL4* (ang. driver) sekwencja kodująca *GAL4* wprowadzana jest pod kontrolą określonego DNA regulatorowego (promotora) z genomu muszki. Jest to promotor genu, którego ekspresja jest tkankowo-specyficzna. To dzięki niemu ekspresja *GAL4* będzie ukierunkowana – białko *GAL4* będzie syntetyzowane jedynie w określonym typie komórek. Z kolei sekwencja regulatorowa *UAS* jest wprowadzana do genomu *D. melanogaster* wraz ze znajdującą się pod jej kontrolą sekwencją kodującą wybrany/badany gen. Jest to gen docelowy (ang. target gene) dla *GAL4*. Ulega on ekspresji jedynie w komórkach syntetyzujących białko *GAL4*. Jego transkrypcja może być aktywowana tylko poprzez przyłączenie się do *UAS* aktywatora transkrypcji, którym jest białko *GAL4* (DUFFY 2002).

Jeżeli sekwencje *GAL4* i *UAS* znajdują się w osobnych szczepach transgenicznym, działanie systemu będzie możliwe dopiero po skrzyżowaniu ze sobą osobników rodzicielskich (P) szczepu *GAL4* (promotor – *GAL4*), ze szczepem *UAS* (*UAS* – wybrany gen). W genomie ich potomstwa (F1) system będzie kompletny (promotor-*GAL4*-*UAS*-wybrany gen), więc dojdzie do ekspresji wybranego genu w określonym typie komórek (Ryc. 3).

Na przykład wykorzystanie w takiej krzyżówce genetycznej szczepu *tim-GAL4*, w którym ekspresja *GAL4* jest kierowana przez promotor genu *timeless* (ang. pancircadian promotor), spowoduje ekspresję *GAL4*, a później także wybranego genu, we wszystkich komórkach, które wyrażają ekspresję *tim*, czyli we wszystkich komórkach zegara biologicznego. Jeśli szczep *tim-GAL4* skrzyżuje się ze szczepem *UAS-ΔCycle* (*ΔCycle* to dominująca, negatywna forma *Cycle*), w F1 dojdzie do zablokowania mechanizmu zegarowego w komórkach zegara.

Metoda krzyżowania w systemie *GAL4/UAS* jest także wykorzystywana do ukierunkowanego wyciszania ekspresji określonego genu *in vivo*. Jest wtedy stosowana w połączeniu z interferencją RNA (KAYA-ÇOPUR i SCHNORRER 2016). W tym przypadku szczep *GAL4* (który nada wyciszeniu specyficzność tkankową) jest krzyżowany ze szczepem *UAS-iRNA* dla wybranego genu (tego typu szczepy są dostępne np.



Ryc. 3. Krzyżówka genetyczna między dziewiczymi samicami szczepu *GAL4* i samcami szczepu *UAS* pokolenia rodzicielskiego (P), pozwala uzyskać osobniki potomne pierwszego pokolenia (F1), w których dochodzi do ekspresji wybranego genu w określonym typie komórek (ramka).

w Vienna Drosophila Resource Center, <https://stockcenter.vdrc.at/control/main>).

System *GAL4/UAS* (opisany tutaj tylko w wersji podstawowej) okazał się być przełomowym rozwiązaniem w nowoczesnych badaniach nad genetycznym i molekularnym podłożem różnych procesów biologicznych, które są prowadzone na modelu *D. melanogaster*. Dotyczy to także badań nad zegarem biologicznym (KANEKO i HALL 2000). Nic dziwnego, że publikacja, w której BRAND i PERRIMON (1993) opisują jego podstawowe założenia była cytowana ponad 7 tysięcy razy. Dzięki takim narzędziom *Drosophila melanogaster* jeszcze lepiej sprawdza się jako model badawczy we współczesnych badaniach, czyli w XXI. w.

PODZIĘKOWANIA

Autorzy dziękują dr Marcie Polańskiej, redaktor naukowej tego zeszytu, za zaproszenie do publikacji artykułu poświęconego *Drosophila melanogaster*.

Streszczenie

Wiele badań nad podstawowymi procesami życiowymi prowadzi się z wykorzystaniem organizmów nazywanych modelowymi. Jednym z nich jest *Drosophila melanogaster*, potocznie nazywana muszką owocową. W artykule przedstawiono rolę tego owada w nagrodzonych Nagrodą Nobla z 2017 r. badaniach nad rytmem okołodobowym i generującym go mechanizmem oscylatora molekularnego (zegara biologicznego). Krótko opisano komórki budujące zegar w mózgu muszki owocowej, tj. neurony i komórki

glejowe z aktywnym oscylatorem komórkowym, które wykazują ekspresję genów zegarowych. Omówiono także podstawowe metody z obszaru genetyki i inżynierii genetycznej stosowane w badaniach nad systemem zegarowym *D. melanogaster*.

LITERATURA

- AHMAD M., LI W., TOP D., 2021. *Integration of circadian clock information in the Drosophila circadian neuronal network*. J. Biol. Rhythms 36, 203-220.
- ALLADA R., WHITE N. E., SO W. V., HALL J. C., ROSBASH M., 1998. *A mutant Drosophila homolog of mammalian Clock disrupts circadian rhythms and transcription of period and timeless*. Cell 93, 791-804.
- BARGIELLO T. A., JACKSON F. R., YOUNG M. W., 1984. *Restoration of circadian behavioural rhythms by gene transfer in Drosophila*. Nature 312, 752-754.
- BĘBAS P., 2010. *O złożoności zegara biologicznego owadów, czyli jak narządy odmierzają czas*. Kosmos 59, 497-511.
- BLAU J., YOUNG M. W., 1999. *Cycling vrille expression is required for a functional Drosophila clock*. Cell 99, 661-671.
- BOLUS H., CROCKER K., BOEKHOFF-FALK G., CHTARBANOVA S., 2020. *Modeling Neurodegenerative Disorders in Drosophila melanogaster*. Int. J. Mol. Sci. 21, doi:10.3390/IJMS21093055.
- BRAND A. H., PERRIMON N., 1993. *Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes*. Development 118, 401-415.
- CELNIKER S. E., RUBIN G. M., 2003. *The Drosophila melanogaster genome*. Ann. Rev. Genomics Hum. Gene 4, 89-117.
- CHIU J. C., LOW K. H., PIKE D. H., YILDIRIM E., EDERY I., 2010. *Assaying locomotor activity to study circadian rhythms and sleep parameters in Drosophila*. J. Visual. Exp. 43, doi:10.3791/2157.
- CYRAN S. A., BUCHSBAUM A. M., REDDY K. L., LIN M.-C., GLOSSOP N. R. J., HARDIN P. E., YOUNG M. W., STORTI R. V., BLAU J., 2003. *vrille, Pdp1, and dClock form a second feedback loop in the Drosophila circadian clock*. Cell 112, 329-341.
- DUFFY J. B., 2002. *GAL4 system in drosophila: A fly geneticist's swiss army knife*. Genesis 34, 1-15.
- EMERY P., SO W. V., KANEKO M., HALL J. C., ROSBASH M., 1998. *CRY, a Drosophila clock and light-regulated cryptochrome, is a major contributor to circadian rhythm resetting and photosensitivity*. Cell 95, 669-679.
- EWER J., FRISCH B., HAMBLIN-COYLE M. J., ROSBASH M., HALL J. C., 1992. *Expression of the period clock gene within different cell types in the brain of Drosophila adults and mosaic analysis of these cells influence on circadian behavioral rhythms*. J. Neurosci. 12, 3321-3349.
- GEKAKIS N., SAEZ L., DELAHAYA-BROWN A. M., MYERS M. P., SEHGAL A., YOUNG M. W., WEITZ C. J., 1995. *Isolation of timeless by PER protein interaction: defective interaction between timeless protein and long-period mutant PERL*. Science 370, 811-815.
- GIEBUŁOWICZ J. M., 2018. *Mechanism of circadian clock*. The 2017 Nobel Prize in physiology or medicine. Kosmos 67, 245-249.
- GLOSSOP N. R. J., HOUL J. H., ZHENG H., NG F. S., DUDEK S. M., HARDIN P. E., 2003. *VRILLE feeds back to control circadian transcription of clock in the Drosophila circadian oscillator*. Neuron 37, 249-261.
- GÖRLICH A., GÓRSKA-ANDRZEJAK J., 2013. *Na początku było „white”*. Wszechświat 114, 123-129.
- GÓRSKA-ANDRZEJAK J., 2011. *Jak „tyka” zegar biologiczny*. Wszechświat 112, 109-114.
- GÓRSKA-ANDRZEJAK J., 2012. *Genetyka systemu GAL4/UAS, czyli jak wywołać tkankowo-specyficzną ekspresję wybranego genu w organizmie muszki owocowej (Drosophila melanogaster)*. Wszechświat 113, 27-31.
- GÓRSKA-ANDRZEJAK J., 2013. *Glia-related circadian plasticity in the visual system of Diptera*. J. Front Physiol. 4, doi:10.3389/fphys.2013.00036. eCollection 2013.
- GÓRSKA-ANDRZEJAK J., GRZMIL P., LABOCHA-DERKOWSKA M., RUTKOWSKA J., STRZAŁKA W., TOMALA K., WIOCH-SALAMON D., 2016. *Poczet modelowych organizmów badawczych*. Wszechświat 117, 194-208.
- GÓRSKA-ANDRZEJAK J., CHWASTEK E. M., WALKOWICZ L., WITEK K., 2018. *On variations in the level of per in glial clocks of drosophila optic lobe and its negative regulation by PDF signaling*. Front Physiol. 9, doi:10.3389/fphys.2018.00230. eCollection 2018.
- HALES K. G., KOREY C. A., LARRACUENTE A. M., ROBERTS D. M., 2015. *Genetics on the fly: A primer on the Drosophila model system*. Genetics 201, 815-842.
- HARDIN P. E., HALL J. C., ROSBASH M., 1990. *Feed-back of the Drosophila period gene product on circadian cycling of its messenger RNA levels*. Nature 343, 536-540.
- HERMANN-LUIBL C., HELFRICH-FÖRSTER C., 2015. *Clock network in Drosophila*. Curr. Opin. Insect Sci. 7, 65-70.
- JACKSON F. R., 2011. *Glial cell modulation of circadian rhythms*. Glia 59, 1341-1350.
- KADENER S., STOLERU D., McDONALD M., NAWATHEAN P., ROSBASH M., 2007. *Clockwork Orange is a transcriptional repressor and a new Drosophila circadian pacemaker component*. Genes Dev. 21, 1675-1686.
- KIM E. Y., EDERY I., 2006. *Balance between DBT/CKI kinase and protein phosphatase activities regulate phosphorylation and stability of Drosophila CLOCK protein*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103, 6178-6183.
- KIM E. Y., KO H. W., YU W., HARDIN P. E., EDERY I., 2007. *A DOUBLETIME kinase binding domain on the Drosophila PERIOD protein is essential for its hyperphosphorylation, transcriptional repression, and circadian clock function*. Mol. Cell. Biol. 27, 5014-5028.
- KLOSS B., PRICE J. L., SAEZ L., BLAU J., ROTHENFLUH A., WESLEY C. S., YOUNG M. W., 1998. *The Drosophila clock gene double-time encodes a protein closely related to human casein kinase Iepsilon*. Cell 94, 97-107.
- KRZEPROWSKI W., WALKOWICZ L., PIŁONCZYŃSKA A., GÓRSKA-ANDRZEJAK J., 2018. *Different levels of expression of the clock protein PER and the glial marker REPO in ensheathing and astrocyte-like glia of the distal medulla of Drosophila optic lobe*. Front. Physiol. 9, doi:10.3389/fphys.2018.00361. eCollection 2018.
- LIM C., CHUNG B. Y., PITMAN J. L., MCGILL J. J., PRADHAN S., LEE J., KEEGAN K. P., CHOE J., ALLADA R., 2007. *Clockwork orange encodes a transcriptional repressor important for circa-*

- dian-clock amplitude in *Drosophila*. *Curr. Biol.* 17, 1082-1089.
- LING J., DUBRUILLÉ R., EMERY P., 2012. KAYAK- α modulates circadian transcriptional feedback loops in *Drosophila* pacemaker neurons. *J. Neurosci.* 32, 16959-16970.
- KANEKO M., HALL J., 2000. Neuroanatomy of cells expressing clock genes in *Drosophila*: Transgenic manipulation of the period and timeless genes to mark the perikarya of circadian pacemaker neurons and their projections. *J. Comp. Neurol.* 422, 66-94.
- KAYA-ÇOPUR A., SCHNORRER F., 2016. A guide to genome-wide in vivo RNAi applications in *Drosophila*. *Meth. Mol. Biol.* 1478, 117-143.
- KONOPKA R. J., BENZER S., 1971. Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68, 2112-2116.
- KUMAR S., CHEN D., JANG C., NALL A., ZHENG X., SEHGAL A., 2014. An ecdysone-responsive nuclear receptor regulates circadian rhythms in *Drosophila*. *Nat. Commun.* 5, 5697.
- MARK B., BUSTOS-GONZÁLEZ L., CASCALLARES G., CONEJERA F., EWER J., 2021. The circadian clock gates *Drosophila* adult emergence by controlling the timecourse of metamorphosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 6, doi:10.1073/pnas.2023249118.
- MARTINEK S., INONOG S., MANOUKIAN A. S., YOUNG M. W., 2001. A role for the segment polarity gene *shaggy*/GSK-3 in the *Drosophila* circadian clock. *Cell* 105, 769-779.
- NG F. N., TANGREDI M. M., JACKSON F. R., 2011. Glial cells physiologically modulate clock neurons and circadian behavior in a calcium-dependent manner. *Curr. Biol.* 21, 625-34.
- PANDEY U. B., NICHOLS C. D., 2011. Human disease models in *Drosophila melanogaster* and the role of the fly in therapeutic drug discovery. *Pharmacol. Rev.* 63, doi:10.1124/PR.110.003293.
- PRICE J. L., BLAU J., ROTHENFLUH A. M., KLOSS B., YOUNG M., 1998. Double-time is a novel *Drosophila* clock gene that regulates PERIOD protein accumulation. *Cell* 94, 83-95.
- REDDY P., ZEHRING W. A., WHEELER D. A., PIRROTTA V., HADFIELD C., HALL J. C., ROSBASH M., 1984. Molecular analysis of the period locus in *Drosophila melanogaster* and identification of a transcript involved in biological rhythms. *Cell* 38, 701-710.
- ROBERTS D. B., 2006. *Drosophila melanogaster*: the model organism. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 121, 93-103.
- ROSATO E., KYRIACOU C. P., 2006. Analysis of locomotor activity rhythms in *Drosophila*. *Nat. Protoc.* 1, 559-568.
- ROSATO E., TAUBER E., KYRIACOU C., 2006. Molecular genetics of the fruit-fly circadian clock. *Eur. J. Hum. Genet.* 14, 729-738.
- RUTILA J. E., SURI V., LE M., SO W. V., ROSBASH M., HALL J. C., 1998. CYCLE is a second bHLH-PAS clock protein essential for circadian rhythmicity and transcription of *Drosophila* period and timeless. *Cell* 93, 805-814.
- SEHGAL A., PRICE J. L., MAN B., YOUNG M. W., 1994. Loss of circadian behavioral rhythms and per RNA oscillations in the *Drosophila* mutant timeless. *Science* 263, 1603-1606.
- SEHGAL A., ROTHENFLUH-HILFIER A., HUNTER-ENSOR M., CHEN Y., MYERS M. P., YOUNG M. W., 1995. Rhythmic expression of timeless: a basis for promoting circadian cycles in period gene autoregulation. *Science* 270, 808-810.
- SIWICKI K. K., EASTMAN C., PETERSEN G., ROSBASH M., HALL J. C., 1988. Antibodies to the period gene product of *Drosophila* reveal diverse tissue distribution and rhythmic changes in the visual system. *Neuron* 1, 141-150.
- STANEWSKY R., KANEKO M., EMERY P., BERETTA B., WAGER-SMITH K., KAY S. A., ROSBASH M., HALL J. C., 1998. The cryb mutation identifies cryptochrome as a circadian photoreceptor in *Drosophila*. *Cell* 95, 681-692.
- SUH J., JACKSON F. R., 2007. *Drosophila* ebony activity is required in glia for the circadian regulation of locomotor activity. *Neuron* 55, 435-47.
- VITATERNA M. H., KING D. P., CHANG A. M., KORNHAUSER J. M., LOWREY P. L., McDONALD J. D., DOVE W. F., PINTO L. H., TUREK F. W., TAKAHASHI J. S., 1994. Mutagenesis and mapping of a mouse gene, clock, essential for circadian behavior. *Science* 264, 719-725.
- YAMAGUCHI M., YOSHIDA H., 2018. *Drosophila* as a model organism. [W:] *Drosophila Models for Human Diseases*. YAMAGUCHI M. (red.). Adv. Exp. Med. Biol. 1076, Springer, Singapore, doi: 10.1007/978-981-13-0529-0_1.
- YU W., HARDIN P. E., 2006. Circadian oscillators of *Drosophila* and mammals. *J. Cell Sci.* 119, 4793-4795.
- ZEHRING W. A., WHEELER D. A., REDDY P., KONOPKA R. J., KYRIACOU C. P., ROSBASH M., HALL J. C., 1984. P-element transformation with period locus DNA restores rhythmicity to mutant, arrhythmic *Drosophila melanogaster*. *Cell* 39, 369-376.
- ZHENG X., SEHGAL A., 2012. Speed control: cogs and gears that drive the circadian clock. *Trends Neurosci.* 35, 574-585.
- ZYCHAL K., GÓRSKA-ANDRZEJAK J., 2014. Zegary glejowe – rola komórek glejowych w plastyczności okołodobowej. *Postępy Biologii Komórki* 41, 129-146.

KOSMOS Vol. 71, 3, 193-202, 2022

JOLANTA GÓRSKA-ANDRZEJAK, DANIEL BAJOREK

*Department of Cell Biology and Imaging, Institute of Zoology and Biomedical Research, Jagiellonian University, 9 Gronostajowa Str.,
30-387 Kraków, E-mail: j.gorska-andrzejak@uj.edu.pl, daniel.bajorek@student.uj.edu.pl*

Drosophila melanogaster – A SIMPLE AND SURPRISINGLY EFFECTIVE MODEL IN THE STUDY OF CIRCADIAN
RHYTHMS AND THE MOLECULAR MECHANISM OF THE BIOLOGICAL CLOCK NOT ONLY IN INSECTS

S u m m a r y

Much research into fundamental biological processes has been carried out using so-called model organisms. One of them is *Drosophila melanogaster*, commonly known as the fruit fly. The article presents the role of this insect in the study of circadian rhythms and the mechanism of the molecular oscillator (the circadian clock) that generates them, which was awarded the Nobel Prize in 2017. We briefly describe the cells that build the clock in the brain of the fruit fly, the neurons, and the glial cells that express clock genes (with an active oscillator). We also briefly present methods in the field of genetics and genetic engineering that made it possible to elaborate on the mechanism of the molecular oscillator of the fruit fly.

Key words: biological clock, circadian rhythms, clock genes, clock neurons, *Drosophila melanogaster*, GAL4/UAS system, glial clocks