

P-ЭЛЕМЕНТ КАК ИНСТРУМЕНТ АНАЛИЗА ГЕНОМА И ПРОТЕОМА *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Е.В. Мариловцева, Л.В. Омелянчук

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Новосибирск, Россия, e-mail: ome@mcb.nsc.ru

В работе рассмотрены классы генетических конструкций, полученных на основе мобильных генетических элементов, используемых в генетическом анализе у *Drosophila melanogaster*.

Ключевые слова: мобильные генетические элементы, *Drosophila melanogaster*, анализ генома, ловушка энхансеров, Gal4-UAS, FLP-FRT.

Введение

Классический генетический анализ был основан на изучении изменений фенотипа особей под действием отдельных мутаций или их комбинаций. Создание генно-инженерных конструкций (назовем их условно аналитическими конструкциями), содержащих привнесенные в геном гены-репортеры и/или гены самого изучаемого организма, существенно расширила возможности генетического анализа. Так, использование истинных мутаций для генетической диссекции некоторого биологического процесса в настоящее время не является единственным способом решения задачи, поскольку имеется несколько методов инактивирования гена на уровне транскрипции или подчинения его действию чужеродного регуляторного элемента. Гиперморфные мутации в классическом генетическом анализе были крайне редки, обычно анализировались рецессивные аллели генов. Системы эктопической экспрессии значительно расширили возможности получения и исследования этого класса мутаций. Селективные схемы нахождения мутаций, затрагивающих определенную функцию, также претерпели изменения. Ловушки для генов и белков позволяют находить гены, работающие в определенной ткани. Использование Gal4-драйверов позволяет отбирать встройки ловушек по их фенотипическому эффекту на рассматриваемый орган. Таким способом может

быть осуществлен более целенаправленный поиск генов, работающих в данном органе.

Настоящая работа представляет собой обзор методов исследования, использующих мобильные генетические элементы в качестве инструмента анализа генов и белков.

1. Ловушка энхансеров. Возможность введения экзогенной ДНК в геном дрозофилы с помощью микроинъекций вектора, сконструированного на основе *P*-элемента дрозофилы, была впервые продемонстрирована в 1982 г. (Rubin, Spradling, 1982). Интеграция чужеродной ДНК в геном обеспечивалась либо с помощью дисгенного скрещивания, либо с помощью примеси вектора, содержащего ген транспозазы *P*-элемента. Дальнейшее развитие этой технологии было связано с получением инсерций вектора P{Delta2-3}, содержащего ген транспозазы *P*-элемента, лишенный интрона между экзонами 2 и 3, что дало возможность получить стабильный геномный источник транспозазы. Дополнительно рассматриваемая инсерция имела делецию одного из повторов *P*-элемента, что делало ее немобильной при действии собственной транспозазы (Robertson *et al.*, 1988). В работе O'Kane и Gehring (1987) была сконструирована ловушка энхансеров – вектор, содержащий репортерный ген бета-галактозидазы, находящийся под контролем слабого промотора транспозазы (рис. 1). В случае введения этого вектора в область хромосомного гена репортерная бета-галактозидаза начинает

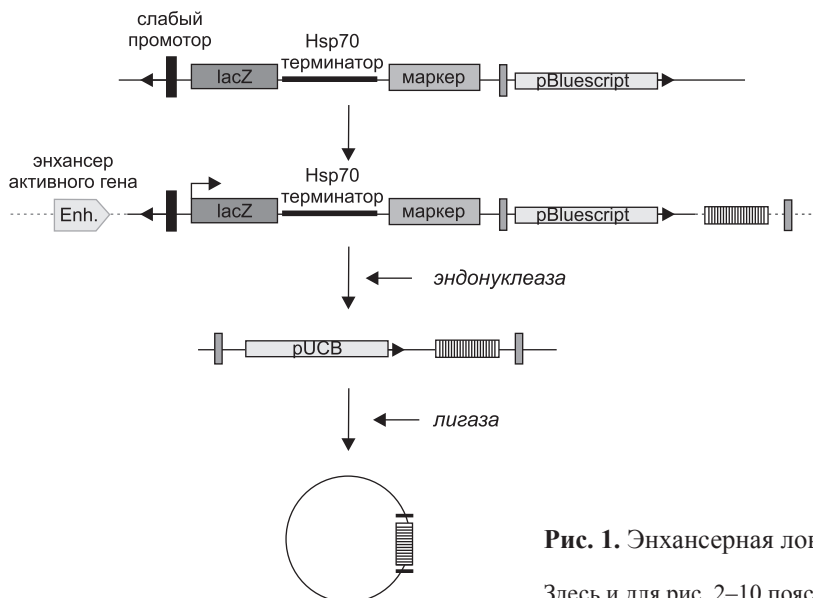


Рис. 1. Энхансерная ловушка.

Здесь и для рис. 2–10 пояснения в тексте.

синтезироваться в тех участках ткани, в которых этот хромосомный ген активен. Дополнительно в векторе была предусмотрена возможность клонирования прилежащей к инсерции геномной ДНК за счет использования внутреннего бактериального вектора, что позволило использовать процедуру «спасения» бактериальной плазмиды для этой цели. Самое существенное достижение рассматриваемой работы состояло в том, что для получения новых встроок *P*-элемента не было необходимости каждый раз трансформировать особей чужеродной ДНК. Новые трансгены могли быть получены с помощью скрещивания, в котором однажды полученная геномная встройка конструкта перемещалась в новые районы под действием стабильного источника транспозазы. Достаточно высокая частота таких перемещений (частота получения новых транспозиций в экспериментах на дрозофиле составляет величину порядка нескольких процентов) впоследствии создала возможность для полного насыщения генома дрозофилы инсерционными мутациями и последующего завершения геномного проекта на дрозофиле (Adams *et al.*, 2000). Генетическая работа с конструктами типа энхансерной ловушки облегчается наличием у них репортеров встраивания (в качестве которых используются гены окраски глаз *Drosophila melanogaster*). Помимо идентификации инсерций это дает возможность получать делеции хромосомной ДНК, соседствующей со встройкой.

2. Gal4-UAS-система эктопической экспрессии.

Энхансерная ловушка предназначена для обнаружения генов, обладающих интересными паттернами экспрессии. Предполагается, что дальнейшее изучение обнаруженного гена будет состоять в клонировании (с помощью встроенного бактериального вектора) и получении мутационных вариантов с помощью неточных эксцизий или незаконной рекомбинации в зародышевой линии самцов. Клонирование гена позволяет получать конструкции, в которых ген экспрессируется под чужеродным промотором. Как оказалось, последнее может быть легко осуществлено и без этапа клонирования. Достаточно внести изменения в структуру исходного вектора. В работе J. Fischer с соавт. (1988) было показано, что дрожжевой белок Gal4 и промотор UAS, с которым Gal4 связывается и начинает транскрипцию, могут функционировать в тканях дрозофилы. Систематическое использование системы началось с работы А.Н. Brand и N. Perrimon (1993), в которой были сконструированы P{GawB}- и P{UAS}-транспозоны. Первый вектор представляет собой энхансерную ловушку, в которой геном-репортером является дрожжевой транскрипционный фактор Gal4. Второй вектор содержит промотор UAS (5 повторенных элементов), фланкированный TATA-боксом от hsp70 промотора, полилинкер для встраивания произвольного гена и SV40 полиА сигнал (рис. 2). Перемещая первый вектор по геному, можно

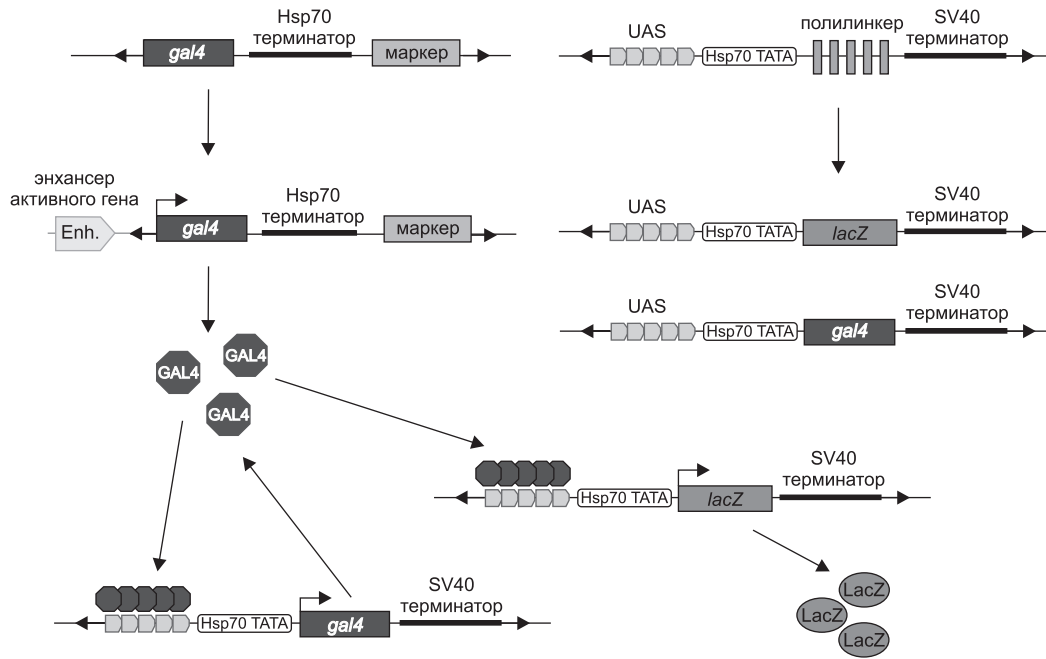


Рис. 2. Gal4-UAS-система для принудительной экспрессии генов.

получить спектр Gal4-драйверов, имеющих различные паттерны экспрессии. Изучаемый ген (или его часть) клонируется во второй вектор и экспрессируется под действием драйвера. Существующее разнообразие драйверов позволяет сверхэкспрессировать исследуемый ген не только в той ткани, где он экспрессируется в норме, но также и в любой другой – мисэкспрессия (для экспрессии в зародышевой линии используют P{UASp}-вектор), что дает возможность более точно найти функцию гена. Поскольку в норме ген может иметь не одну фазу экспрессии в онтогенезе и экспрессироваться не в одной ткани, то Gal4-UAS-система позволяет дифференциально изучать каждую фазу и каждую ткань отдельно. Интересной возможностью, полученной в результате такой модификации энхансерной ловушки, является введение в геном в дополнение к Gal4-UAS-системе конструкта UAS-Gal4 (Hassan, 2000). Это дает возможность создать положительную петлю обратной связи, которая усилит экспрессию изучаемого гена, и полезно для изучения слабоэкспрессирующихся генов.

Описанный выше вариант использования Gal4-UAS-системы основан на получении серии Gal4-драйверов, под действием которых проводится сверхэкспрессия изучаемого гена. Однако подвижным может быть не только элемент,

содержащий Gal4, но и элемент, содержащий UAS. В работе Rorth (1996) был сконструирован P{EP}-элемент, содержащий GAGA-сайт (2 копии), UAS-сайт (14 копий) и hsp70-промотор, направляющий экспрессию гена, в который произойдет встройка в направлении от сайта внедрения конструкта (рис. 3). Случайные перемещения этого элемента по геному позволили создать коллекцию EP-встройек. Такая коллекция используется для нахождения генов, которые активны в заданной ткани, путем соединения в одном генотипе Gal4-драйвера, обладающего нужной ткане- или стадиейспецифичностью. Если некоторая EP-инсерция в комбинации с драйвером дает мутантный фенотип, получающийся в результате мисэкспрессии, то соответствующий ген подвергается дальнейшему изучению (Rorth, 1996).

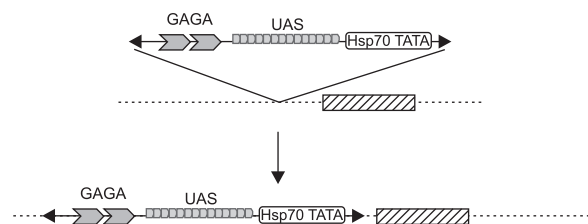


Рис. 3. EP-элемент.

3. Направленное создание делеций. Возможность конструирования синтетических делеций как комбинации двух транслокаций Y-хромосомы известна давно (Lindsley *et al.*, 1972). Этот подход позволил покрыть весь геном этого модельного организма синтетическими делециями и найти все гаплочувствительные локусы. По существу, этот метод может считаться предшественником современных полногеномных технологий. Однако делеции, получаемые этим способом, являются слишком протяженными и не могут удовлетворить современные запросы. Предложен подход, основанный на генерации случайных транспозиций специальных конструкций (*RS3* и *RS5*) в различные районы генома с последующей генерацией обменов между внутренними FRT-сайтами полученных встроок (Golic K., Golic M., 1996). Элемент *RS3* представляет собой *P*-элемент, содержащий ген w^+ , прерываемый интроном. Один FRT-сайт содержится в интроне, а другой (в той же ориентации) – в 3'-участке гена w^+ . Элемент *RS5* устроен аналогично – один FRT-сайт расположен в интроне, а другой – в 5'-области гена w^+ , кроме того, вся конструкция противоположно ориентирована относительно 5'- и 3'-повторов *P*-элемента. Находящиеся в интронах FRT-сайты не мешают сплайсингу гена w^+ , поэтому он проявляется в исходной линии и в линиях с новыми транспозициями этих элементов (рис. 4). Следующим шагом в получении коллекции делеций является про-

ведение выщепления (FLP-опосредованного) генетического материала, находящегося между FRT-сайтами перемещенного элемента. При этом маркер w^+ исчезает, поскольку один из его экзонов элиминируется. Эта процедура проводится как для инсерций *RS3*, так и для инсерций *RS5*. Далее выбранные инсерции *RS3* и *RS5* объединяются в геноме, и с помощью действия FLP-рекомбиназы проводится рекомбинация между гомологичными хромосомами, содержащими инсерции. Рекомбинационное событие, приводящее к возникновению дупликации, может быть обнаружено по восстановлению экспрессии маркера w^+ . Практически этот подход для дрозофилы был реализован в полногеномном варианте в работе E. Ryder с соавт. (2004). Этот метод позволяет охарактеризовать точки разрывов делеции с точностью до одного нуклеотида с помощью инверс-PCR (рестрикция геномной ДНК, лигирование в кольца, PCR с праймеров на последовательность транспозона, направленных в сторону прилегающей геномной ДНК). Альтернативный метод насыщения генома дрозофилы делециями с точно картированными точками разрывов был предложен в работе (Huet *et al.*, 2002). Транспозон $P\{wHy\}$, сконструированный в этой работе, представляет собой *P*-элемент, содержащий внутренний транспозон *hobo*, фланкированный генами y^+ и w^+ соответственно с 3'- с 5'-концов (рис. 5). Сначала проводится мобилизация этого транспозона с помощью транспозазы *P*-эlemen-

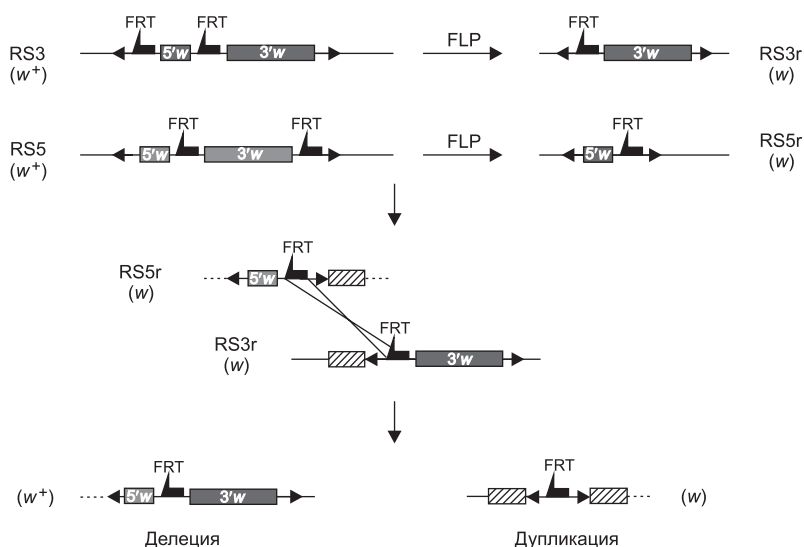


Рис. 4. Направленное получение делеций.

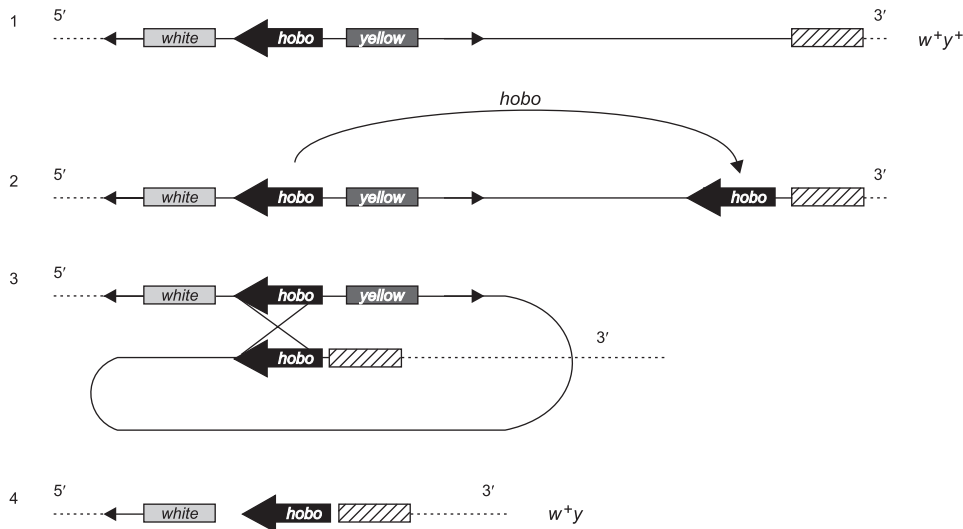


Рис. 5. Использование транспозона *hobo* для получения локализованных делеций.

та для получения инсерций в различные места генома. На втором шаге проводится мобилизация внутреннего транспозона *hobo* с помощью *hobo*-транспозазы, которая вводится в геном. Поскольку *hobo* имеет высокую частоту репликативных внутрихромосомных перемещений, то высока вероятность получения его встройки в окрестности исходной инсерции (без потери последовательности исходного внутреннего *hobo*). На третьем шаге (выделение третьего шага – условность; на самом деле эти события происходят у тех же особей, у которых вызваны перемещения *hobo*) под действием *hobo*-транспозазы происходит внутрихромосомная рекомбинация между двумя *hobo*-элементами, приводящая к появлению делеций. Направление делеций определяется по исчезновению w^+ или y^+ .

4. Направленный мутагенез. Метод введения мутаций в заданный ген дрозофилы был разработан в работе У. Rong и К. Golic (2001). Для введения мутации в ген *X* получают донорный конструкт FRT-*X1*-(I-SceI)-*X2*-*MarkerGene*-FRT, фланкированный повторами *P*-элемента, и с их помощью вводят конструкт в геном дрозофилы. *X1* и *X2* – участки гена *X* в прямой ориентации, которые могут содержать вводимые мутации (I-SceI) – сайт разрезания homing-нуклеазы (CAAAACGTCGTGAGACAGTTTG) (рис. 6). С помощью скрещиваний конструируют генотип, в котором донорный конструкт сочетается с двумя другими: hsFLP и hsI-SceI. Таких особей

на стадии личинки подвергают тепловому шоку, в результате которого FLP-рекомбиназа «выщепляет» участок донорного конструкта между FRT-сайтами, превращая его в экстрахромосомное кольцо ДНК. Нарботанная в результате активации тепловым шоком I-SceI-нуклеазы вводит рекомбиногенный двуцепочечный разрыв в экстрахромосомное кольцо. Прямая ориентация *X1* и *X2* в донорном конструкте (и инвертированная после действия I-SceI) определяет способ рекомбинации участка с эндогенным геном *X*. В рассматриваемом случае это (ends in) рекомбинация, продуктом которой является дупликация эндогенного гена *X*, такая, что один член дупликации содержит замену, имевшуюся в *X1*-, а другой – в *X2*-участке. Члены дупликации разделены маркерным геном и прилежащим к нему FRT-сайтом. Рекомбинационные события внедрения находят в генетических скрещиваниях, наблюдая за перемещением маркера из исходного хромосомного сайта локализации донорного конструкта в район локализации эндогенного гена *X* (они должны находиться в разных хромосомах). Ends out донорный конструкт, предназначенный для введения мутации, имеет структуру *MarkerGene*-FRT-(I-SceI)-*X*-(I-SceI)-FRT. После FRT-зависимого выщепления экстрахромосомной копии ДНК и разрезания нуклеазой I-SceI получается цельный участок *X*, несущий мутацию. В результате рекомбинации, индуцированной разрывом, имеется вероят-

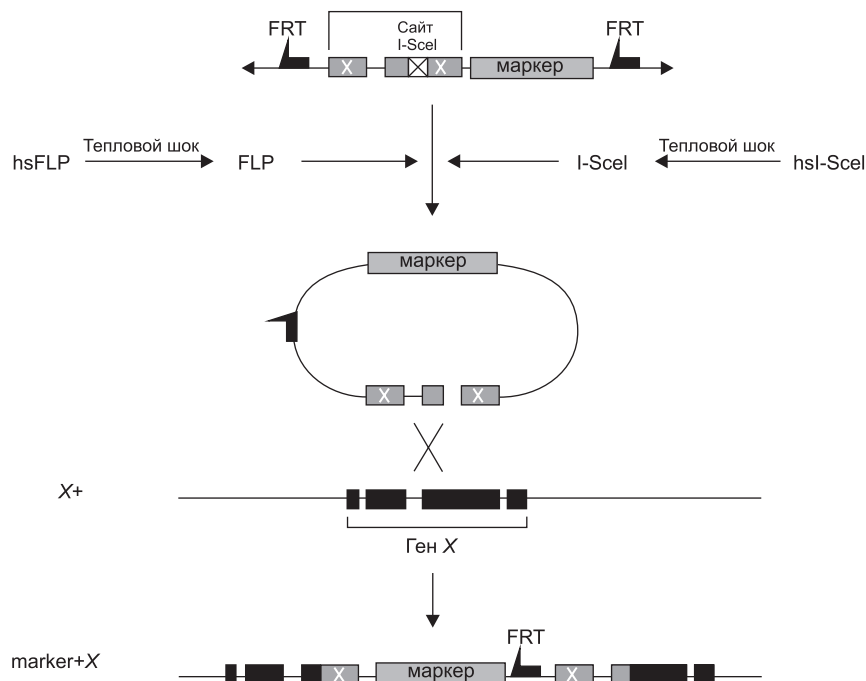


Рис. 6. Направленный мутагенез.

ность того, что два рекомбинационных обмена, расположенных по краям X , вносят требуемую замену в эндогенную копию этого гена (Gong, Golic, 2003). Эффективность обоих методов мало отличается.

Описанная выше стратегия основана на использовании синтетической (homming) нуклеазы цинкового пальца с повышенной специфичностью (homming – самонаводящейся) для генерации двуцепочечных разрывов в специфических сайтах генома. Последующая репарация двойных разрывов через спаривание негомологичных концов с высокой частотой будет индуцировать делеции и/или инсерции в месте соединения. Синтетическая нуклеаза цинкового пальца включает неспецифический ДНК-расщепляющий домен из эндонуклеазы Fok I и ДНК-связывающий домен, представленный тремя Cys2His2 цинковыми пальцами (Wah, 1998; Rabo *et al.*, 2001). Конструирование доменов с цинковыми пальцами необходимо для того, чтобы связывать специфические ДНК последовательности, а нуклеазный домен – чтобы генерировать двуцепочечные разрывы в этом сайте (Gong, Golic, 2003).

5. Ловушки для генов и белков. У дрозофилы энхансерные ловушки встраиваются чаще

в регуляторный район гена, чем в его кодирующую область, и поэтому часто не приводят к истинной генной мутации. Для поиска инсерций в кодирующую область гена была создана конструкция $P\{GTI\}$. Этот транспозон содержит донорный сайт сплайсинга, кодирующую область Gal4-белка и терминатор Hsp70. После внедрения конструкции в интрон гена кодирующая область Gal4 будет считана с 5'-лежащим экзоном этого гена; в результате этого будет образован гибридный белок, способный управлять UAS-конструкциями. Рассматриваемый конструкт также содержит ген w^+ , обладающий промотором, лишен сигнала полиА и имеет 5'-акцепторный сайт сплайсинга. Функциональный транскрипт гена w^+ появляется только тогда, когда происходит соединение кодирующей области w^+ с 3'-лежащими экзонами гена. Оба события – образование гибридного Gal4 и функционального w^+ (по которому идентифицируется встройка) – происходят одновременно, поэтому эта система получила название двойного попадания в ген (dual tagging gene trap) (Lukacsovich, 2001) (рис. 7).

По сходной идее сконструирована и белковая ловушка GFP, представляющая собой транспозон, который, встраиваясь в интрон гена,

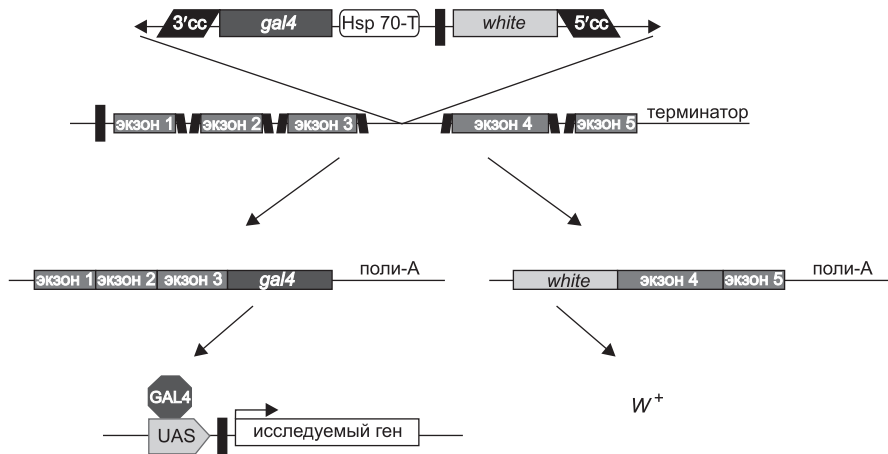


Рис. 7. Ловушка для двойного попадания в ген.

приводит к образованию в нем искусственного экзона, кодирующего GFP-белок (Morin *et al.*, 2001). Кодированная область гена *GFP* содержит донорный и акцепторный сайты сплайсинга на своих концах (рис. 8). В результате транскрипции и последующего сплайсинга может образовываться м-РНК, включающая *GFP*-экзон. При трансляции этой мРНК получается белок, содержащий полноразмерную *GFP*-часть, т. е. способный флуоресцировать. Поскольку имеются три варианта конструкции, содержащие кодирующую область *GFP* с различными сдвигами рамки считывания, то возможно осуществить попадание в любой ген с помощью одной из них. Гибридные GFP-белки крайне полезны для решения многих проблем молекулярной генетики дрозофилы. Если получена вставка в ген, то технически легко изучить паттерн

экспрессии белка в развитии, определить локализацию белка в клетке, изучить динамические свойства белка в клетке.

В настоящее время в базе данных FlyTrap описаны 1522 встройки *GFP*-ловушки. Всего у дрозофилы имеется около 14 тыс. генов, среди них только для 271 гена имеются встройки *GFP*-ловушки, с которых правильно считывается гибридный GFP-белок. Таким образом, в настоящее время насыщение генома дрозофилы такими ловушками далеко не достигнуто. Вопрос был проанализирован в работе J. Aleksic (2009). Было сделано заключение о том, что для успешного насыщения генома нужно либо изготовить *GFP*-ловушку на основе менее специфичного к сайту инсерции транспозона, либо применить стратегию массового получения векторов, содержащих *GFP* кодирующую область, к которой

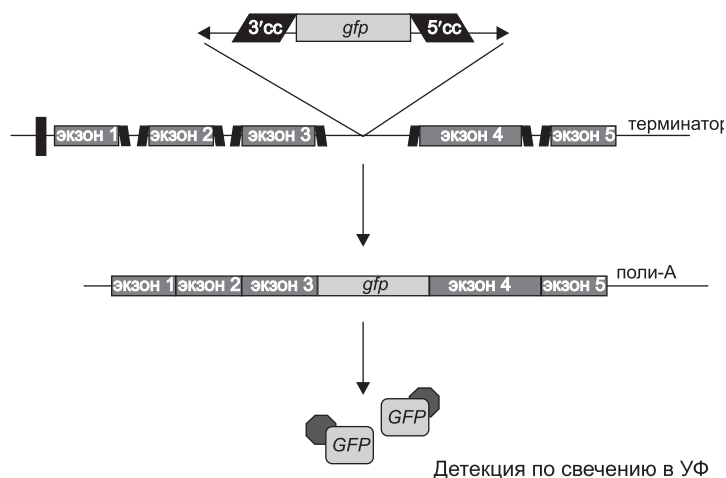


Рис. 8. GFP-ловушка.

«пришита» библиотека белков дрософилы, с последующей трансформацией зародышевой линии дрософилы клонами этой библиотеки.

6. FLP-FRT система для генерации соматического мозаицизма. У дрософилы многие гены развития имеют один фокус действия в эмбриогенезе, а другой – на более поздних стадиях. Для того чтобы исследовать второй фокус действия прибегают к изучению фенотипа мутации в мозаичных пятнах. FLP-рекомбиназа, находящаяся под контролем промотора генов теплового шока, может быть индуцирована в любой точке развития. Это дает возможность индуцировать мозаичный клон, после того как особь пройдет первый фокус действия мутации. У дрософилы созданы линии, содержащие FRT в основании каждого из хромосомных плеч. Это позволяет получить клоны, в которых любое из плеч находится в гомозиготном состоянии, таким образом, любая мутация может быть переведена в гомозиготное состояние (Хц, 1993). В частности, этим методом удается находить мутации по расхождению хромосом в мозаичных клонах зародышевой линии (Fedorova *et al.*, 2001).

Другим подходом к изучению многофокусных мутаций является создание конструктов, содержащих конститутивный промотор (например, промотор гена актина), отделенный от кодирующей области изучаемого гена кассетой FRT-сайтов. Индукция FLP-рекомбиназы на желаемой стадии развития индуцирует выщепление FRT-кассеты, и изучаемый ген сближается с конститутивным промотором (рис. 9). Это позволяет получить сильную эктопическую экспрессию гена в ограниченном участке ткани (Struhl, Basler, 1993). Предложены также подходы для выключения гена с помощью FLP-FRT опосредованной эксцизии гена из конструкта.

Экстрахромосомная копия гена легко теряется при интенсивных клеточных делениях, но может не успеть потеряться в поздних клонах. Для преодоления этой трудности предложено выщеплять из конструкта один из экзонов гена (Ahmad, Golic, 1996).

7. Ингибирование активности генов с помощью явления РНК-интерференции. Явление РНК-интерференции заключается в том, что при попадании двухцепочечной РНК в клетку она фрагментируется на 20–25 п.н. участки под действием РНКазы Dicer2 (у дрософилы) (Liu *et al.*, 2003). Эти короткие РНК включаются в состав RISC-комплексов и определяют специфичность этих комплексов при разрушении ими матричных РНК.

РНК-интерференция может быть применена для ингибирования транскрипции гена в условиях культуры тканей или при инъекциях, однако наиболее распространенным применением является транскрипция трансгенов. Конструкт для РНК-интерференционного ингибирования гена *X* представляет собой вектор, имеющий UAS-промотор, под который клонируется ген *X* (или его участок) и его инвертированная копия (рис. 10). В результате эктопической экспрессии возникает РНК шпилька, которая служит субстратом для РНК интерференции. Несмотря на положительные результаты, полученные на этом пути, оказалось, что конструкты, имеющие шпильку, нестабильны в соматических тканях (Giordano *et al.*, 2002). Это заставило совершенствовать метод. Если разделить инвертированные повторы с помощью фрагмента ДНК, фланкированного сайтами сплайсинга, то проблема стабильности повторов решается. В то же время после вырезания такого искусственного интрона получается шпилька, обладающая

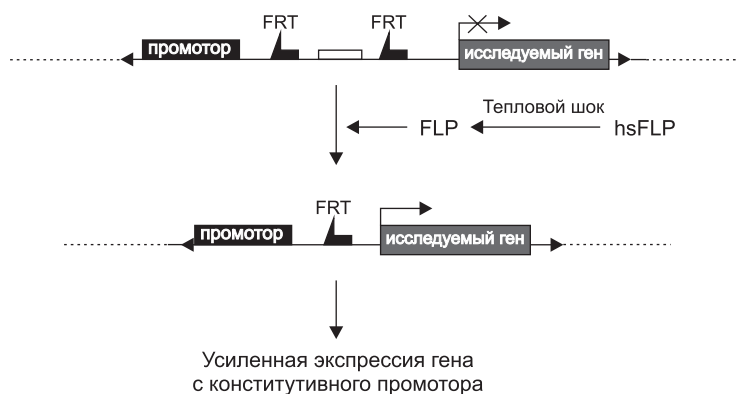


Рис. 9. Принудительная экспрессия гена в мозаичном клоне.

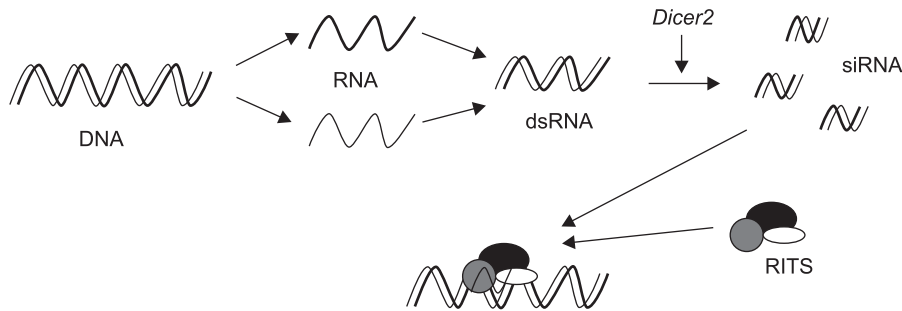


Рис. 10. Ингибирование действия гена с помощью РНК-интерференции.

РНК-интерференционными свойствами (Lee, Carthew, 2003). Другое решение проблемы стабильности состоит в том, чтобы фрагмент ДНК, используемый для транскрипции, имел два UAS-промотора, один в прямой ориентации, а другой – в инвертированной для транскрипции противоположной цепи ДНК (Giordano *et al.*, 2002).

Заключение

Несмотря на то что в проекты секвенирования геномов вовлекается все больше различных видов, вряд ли следует ожидать появления новых аналитических конструкций для их анализа, поскольку уже существующие способны обеспечить решение задач определения функции данного гена. В то же время хорошая изученность генов модельных эукариот стимулирует постановку задач о построении карты взаимодействий всех пар генов модельного организма. Дрожжевая дигибридная система для поиска пар взаимодействующих белков является одним из подходов к решению этой задачи. Существующая общедоступная информация, полученная в рамках этого подхода, показывает его недостаточную разрешающую способность. Поэтому на дрожжах проводятся работы по изучению парных генетических взаимодействий между мутациями (в определенном смысле это возвращение к классическому генетическому анализу) (Tong *et al.*, 2001, 2004). По всей вероятности, это направление генетических исследований со временем получит развитие и на рассматриваемых в данном обзоре модельных системах. Для того чтобы технология регистрации генных взаимодействий, детектируемых по морфологии, получила полногеномное раз-

витие, необходимо, чтобы имелись большие коллекции мутаций. Мы полагаем, что такое развитие будет проходить через использование UAS-конструктов для эктопической экспрессии генов или, что более вероятно, за счет использования решающих ту же задачу коллекций EP-элементов. Возможна также другая, более близкая к клеточной биологии, ветвь исследования генных взаимодействий на уровне белков. Известно явление Fluorescence resonance energy transfer (FRET), заключающееся в том, что энергия возбужденной молекулы одного флуорохрома может переноситься на молекулу другого флуорохрома и излучаться ею в другом спектральном диапазоне, если расстояния между молекулами меньше радиуса Форстера (1–10 Å) (Selvin, 2000). Поскольку показано, что явление FRET происходит между синим флуоресцентным (BFP-донор FRET) и зеленым флуоресцентным (GFP-акцептор FRET) белками (Cubitt *et al.*, 1995), то возникает возможность создания двух коллекций инсерций генных ловушек, одна из которых снабжена BFP, а другая GFP. С помощью генетических скрещиваний пары ловушек могут быть объединены в одном геноме и интенсивность FRET (пропорциональная близости белков) между ними в различных клетках может быть оценена с помощью соответствующей микроскопии.

Работа поддерживалась проектами РФФИ 10-04-00652-а и 11-04-00256-а.

Литература

Adams M.D., Celniker S.E., Holt R.A. *et al.* The genome sequence of *Drosophila melanogaster* // Science. 2000. V. 287. N 5461. P. 2185–2195.

- Ahmad K., Golic K.G. Somatic reversion of chromosomal position effects in *Drosophila melanogaster* // *Genetics*. 1996. V. 144. N 2. P. 657–670.
- Aleksic J., Lazic R., Müller I. *et al.* Biases in *Drosophila melanogaster* protein trap screens // *BMC Genomics*. 2009. V. 10. P. 249.
- Brand A.H., Perrimon N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes // *Development*. 1993. V. 118. N 2. P. 401–415.
- Cubitt A.B., Heim R., Adams S.R. *et al.* Understanding, improving and using green fluorescent proteins // *Trends Biochem. Sci.* 1995. V. 20. N 11. P. 448–455.
- Fedorova S., Nokkala S., Chubykin V., Omelyanchuk L. The isolation of a mutation causing abnormal cytokinesis in male and split chromocenter in female meiosis in *Drosophila melanogaster* // *Hereditas*. 2001. V. 134. N 2. P. 125–134.
- Fischer J.A., Giniger E., Maniatis T., Ptashne M. GAL4 activates transcription in *Drosophila* // *Nature*. 1988. V. 332. P. 853–856.
- Giordano E., Rendina R., Peluso I., Furia M. RNAi triggered by symmetrically transcribed transgenes in *Drosophila melanogaster* // *Genetics*. 2002. V. 160. N 2. P. 637–648.
- Golic K.G., Golic M.M., Engineering the *Drosophila* genome: chromosome rearrangements by design // *Genetics*. 1996. V. 144. P. 1693–1711.
- Gong W.J., Golic K.G. Ends-out, or replacement, gene targeting in *Drosophila* // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2003. V. 100. N 5. P. 2556–2561.
- Hassan B.A., Bermingham N.A., He Y. *et al.* *atonal* regulates neurite arborization but does not act as a proneural gene in the *Drosophila* brain // *Neuron*. 2000. V. 25. N 3. P. 549–561.
- Huet F., Lu J.T., Myrick K.V. *et al.* A deletion-generator compound element allows deletion saturation analysis for genomewide phenotypic annotation // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2002. V. 99. N 15. P. 9948–9953.
- Lee Y.S., Carthew R.W. Making a better RNAi vector for *Drosophila*: use of intron spacers // *Methods*. 2003. V. 30. P. 4. P. 322–329.
- Lindsley D.L., Sandler L., Baker B.S. *et al.* Segmental aneuploidy and the genetic gross structure of the *Drosophila* genome // *Genetics*. 1972. V. 71. P. 157–184.
- Liu Q., Rand T.A., Kalidas S. *et al.* R2D2, a bridge between the initiation and effector steps of the *Drosophila* RNAi pathway // *Science*. 2003. V. 301. N 5641. P. 1921–1925.
- Lukacsovich T., Aszталos Z., Awano W. *et al.* Dual tagging gene trap of novel genes in *Drosophila melanogaster* // *Genetics*. 2001. V. 157. P. 727–742.
- Morin X., Daneman R., Zavortink M., Chia W. A protein trap strategy to detect GFP-tagged proteins expressed from their endogenous loci in *Drosophila* // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2001. V. 98. N 26. P. 15050–15055.
- O’Kane C., Gehring W.J. Detection *in situ* of genomic regulatory elements in *Drosophila* // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1987. V. 84. P. 9123–9127.
- Pabo C.O., Peisach E., Grant R.A. Design and selection of novel Cys2His2 zinc finger proteins // *Annu. Rev. Biochem.* 2001. V. 70. P. 313–340.
- Robertson H.M., Preston C.R., Phillis R.W. *et al.* A stable genomic source of P element transposase in *Drosophila melanogaster* // *Genetics*. 1988. V. 118. N 3. P. 461–470.
- Rong Y.S., Golic K.G. A targeted gene knockout in *Drosophila* // *Genetics*. 2001. V. 157. N 3. P. 1307–1312.
- Rorth P.A. A modular misexpression screen in *Drosophila* detecting tissue-specific phenotypes // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1996. V. 93. N 22. P. 12418–12422.
- Rubin G.M., Spradling A.C. Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors // *Science*. 1982. V. 218. N 4570. P. 348–353.
- Ryder E., Blows F., Ashburner M. *et al.* The DrosDel collection: A set of P-element insertions for generating custom chromosomal aberrations in *Drosophila melanogaster* // *Genetics*. 2004. V. 167. P. 797–813.
- Selvin P.R. The renaissance of fluorescence resonance energy transfer // *Nat. Struct. Biol.* 2000. V. 7. N 9. P. 730–734.
- Struhl G., Basler K. Organizing activity of wingless protein in *Drosophila* // *Cell*. 1993. V. 72. N 4. P. 527–540.
- Tong A.H., Evangelista M., Parsons A.B. *et al.* Systematic genetic analysis with ordered arrays of yeast deletion mutants // *Science*. 2001. V. 294. N 5550. P. 2364–2368.
- Tong A.H., Lesage G., Bader G.D. *et al.* Global mapping of the yeast genetic interaction network // *Science*. 2004. V. 303. N 5659. P. 808–813.
- Xu T., Rubin G.M. Analysis of genetic mosaics in developing and adult *Drosophila* tissues // *Development*. 1993. V. 117. N 4. P. 1223–1237.
- Wah D.A., Bitinaite J., Schildkraut I., Aggarwal A.K. Structure of FokI has implications for DNA cleavage // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1998. V. 95. N 18. P. 10564–10569.

**P ELEMENT AS A TOOL FOR ANALYSIS
OF THE *DROSOPHILA MELANOGASTER* GENOME AND PROTEOME**

E.V. Marilovtseva, L.V. Omel'yanchuk

Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, SB RAS, Novosibirsk, Russia,
e-mail: ome@mcb.nsc.ru

Types of genetic constructs derived from transposable elements and used in the genetic analysis of *Drosophila melanogaster* are considered.

Key words: transposable elements, *Drosophila melanogaster*, genome analysis, enhancer trap, Gal4-UAS, FLP-FRT.