

果蝇基因组与功能基因研究进展^{*}

刘素宁 沈 杰^{**}

(中国农业大学农学与生物技术学院昆虫学系 北京 100193)

摘 要 黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 是生物科学研究中重要的模式动物之一。2000 年,黑腹果蝇全基因组测序完成,随后基因组序列质量不断完善,对其功能基因进行深入研究,为其他高等动物基因组和功能基因的研究提供了巨大帮助。本文综述了近年来基因组功能元件、比较基因组学等方面的最新研究成果,着重介绍了功能基因在 Hh 信号通路、细胞凋亡方面的研究进展,并对最新的功能基因研究技术进行了简要概述。

关键词 果蝇, 基因组, 功能基因, 信号通路, 细胞凋亡

Progress in research on functional genes in the *Drosophila* genome

LIU Su-Ning SHEN Jie^{**}

(Department of Entomology, College of Agriculture and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract *Drosophila* is one of the most important model organisms in the life sciences. The sequencing of the *Drosophila melanogaster* genome, completed in 2000, has provided a number of important contributions to research on the genome and functional genes. In this review, we summarize historical landmarks in the *Drosophila* genome with a focus on functional elements and comparative genomics. Recent findings regarding the Hh signaling pathway and apoptosis are highlighted and the most widely used advanced experimental techniques are briefly introduced.

Key words *Drosophila*, genome, functional genes, signaling pathway, apoptosis

1 引言

黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 是生物与基础医学研究领域中最重要生物材料之一,早在 2000 年就完成全基因组序列测定 (Adams *et al.*, 2000),它在基因组学和基因功能研究等领域取得了许多辉煌的成就。作为模式动物的黑腹果蝇有很多优势:(1)易饲养:黑腹果蝇的饲养需要很小的空间和设备,饲料成本低,非常适用于实验室饲养。(2)生长周期短:包括卵期、幼虫期、蛹期、成虫形成与产卵,可在 25℃ 条件下 10 d 左右完成。(3)高繁殖:雌虫每天可产多达 100 枚卵,一生可产大约 2 000 枚卵。(4)雌雄易分辨:雌雄差异明显,未交配的雌虫容易辨识,方便后续杂交试验。(5)基因组小:黑腹果蝇基因组仅有 4 对染色体,约 180 Mb。(6)平衡子:纯合致死的平衡子染色体携带可方便观察的遗传标记,易于保种、鉴定。

(7)遗传工具丰富:具有丰富的基因突变和转基因品系,以及方便的基因抑制、表达和过表达系统。(8)基因保守性高:果蝇的基因与高等动物以及人类的诸多基因具有在结构和功能上的高保守性,果蝇上的研究成果可以借鉴或应用到生物医学领域中。

2 果蝇基因组学

黑腹果蝇基因组的总大小约为 180 Mb,含有 3 对常染色体和 1 对性染色体(X,Y),它被粗略的划分为三分之二的常染色质和三分之一的异染色质,120 Mb 的常染色质分布在 2 个大的染色体(第 2、3 条)、X 染色体和第 4 条染色体上。异染色质集中在所有染色体的调聚区和着丝粒附近,它含有衔接的简单重复序列(包括卫星 DNA),中度重复元件(例如转座子元件和核糖体 DNA)以及一些单拷贝 DNA。由于重复元件在克隆、绘图、拼接

^{*} 资助项目:国家自然科学基金面上项目(NSFC31071696)。

^{**} 通讯作者, E-mail: shenjie@cau.edu.cn

收稿日期:2011-10-06,接受日期:2011-10-26

上的困难,阻碍了异染色质的基因组分析,直到 2007 年异染色质的测序成功,这些问题才得到很好的解决。

2.1 表达序列标签和 cDNA 资源

表达序列标签为基因的存在和基因结构提供了有价值的证据。BDGP 建立 *Drosophila* Gene Collection (DGC), 利用表达序列标签进行计算分析, 从而鉴定假定的全长 cDNA。全长 cDNA 为确定基因的内含子和外显子结构以及选择性剪接的探测提供了最精确的证据, 同样为蛋白质组学和基因功能分析提供了重要的资源。第 1 次基因组发布利用了大约 80 000 个表达序列标签和 2 500 个全长 cDNA, 第 3 次发布增长到了约 250 000 个表达序列标签和 8 921 个全长 cDNA (Drysdale, 2003)。到目前为止, 根据不同的发育阶段和发育组织, GenBank 共收录了 821 005 个黑腹果蝇表达序列标签 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucest>)。

2.2 基因组结构注释

基因组的常染色质部分包含了整个基因组大约 98% 的蛋白质编码基因, 最初注释的目的是获得精确的基因结构。第 1 次发布的序列中, Annotation Jamboree 集结了众多优秀的生物信息专家和生物学者, 他们的空前合作使这次基因组注释仅用 2 个星期就完成, 这次注释共报道了 13 601 个基因 (Adams *et al.*, 2000)。然而第 1 次发布的序列的不完全性, 也决定了这次注释是不完全的。随后 Karlin 团队 (2001) 和 Misra 团队 (2002) 都对这次注释进行了比对修改。第 3 次发布将蛋白质编码基因数修改为 13 792 个, 并报道了 102 个 rRNA 基因, 288 个 tRNA 基因, 23 个 microRNA 基因, 28 个 snRNA 基因和 28 个 snoRNA 基因, 40 个假基因, 58 个非蛋白编码 RNA 基因和 7 761 个 Transposon Insertions (<http://www.fruitfly.org>)。第 5 次发布的序列注释中, 异染色质中含有 613 个蛋白编码基因, 13 个非蛋白编码基因, 32 个假基因 (Smith *et al.*, 2007)。

2.3 转座因子

转座因子 (transposable elements, TEs) 是一类可移动的重复 DNA 序列, 普遍存在于真核生物基因组中, 对基因组结构、功能、进化具有重要的作用 (Wessler, 2006)。真核生物基因组含有大量的

重复序列, 这些重复序列有很大一部分是由转座因子组成, 它们能插入到基因中或基因调控元件中, 从而有可能影响基因的功能, 也能触发染色体重新排列 (Biemont and Vieira, 2006)。45% 的人类基因组中含有转座因子, 然而只有 0.1% 的突变是由于它们插入到基因中。而在黑腹果蝇基因组中, 只有 15% 的基因组含有转座因子, 但是黑腹果蝇 80% 的自发突变是由于转座因子插入或转座因子引起的染色体重新排列造成的, 这说明宿主基因组在控制转座因子活力上是不同的 (Deloger *et al.*, 2009)。基因组的第 3 次发布是首次精确描绘重复序列, Kaminker 等 (2002) 鉴定出 1 500 多种转座因子, 几乎占常染色质的 4%。Fontanillas 等 (2007) 对黑腹果蝇基因组常染色体部分的转座因子精细分布进行了分析, 结果指出转座因子插入点偏向于生殖系表达基因, 局部转座因子密度是由基因组局部紧密度决定的, 所以基因组结构和基因表达对转座因子的精细分布有重要影响。Deloger 等 (2009) 对已测序的黑腹果蝇基因组进行鉴定, 发现约 73% 的转座因子家族可以进行转录, 这说明黑腹果蝇基因组含有大量的活性因子, 他们鉴定了 202 个转座因子拷贝, 发现其中 69 个拷贝可以被准确的定位在单一基因座上, 一半的拷贝主要插入在基因的非编码区域。

2.4 比较基因组学

果蝇属包含了约 2 000 个种, 它们在形态、生态以及行为上都具有很明显的差异性 (Markow and O'Grady, 2007)。在同一个谱系框架中进行多基因组的比对分析对进化推论的精确性具有提高作用。2007 年, 包含了大量科学家的果蝇基因组团队对包括黑腹果蝇在内的 12 个果蝇种类进行了全基因组比对与分析, 其中有 10 种是第 1 次发布全基因组信息, 它们拼接的基因组最小的 137.8 Mb (*D. mojavensis*), 最大的达到 364 Mb (*D. virilis*), 总蛋白质编码序列最小的 38.9 Mb (*D. melanogaster*), 最大的 65.4 Mb (*D. willistoni*)。利用黑腹果蝇基因组注释手段, 对非黑腹果蝇基因组进行注释发现, 77% 的蛋白质编码基因在 12 种果蝇中存在同源基因, 他们还对转座因子、非编码 RNA 基因家族等的自然进化进行了系统分析, 这些基因组信息更加坚定了黑腹果蝇作为动物遗传学研究的模式动物的地位, 也进

一步促进了众多基础研究的深入进行 (Clark *et al.*, 2007)。为了更好的分析基因组的进化并为黑腹果蝇基因组的功能注释提供更多的参考依据,这些基因组信息还是远远不够的。2011 年, Song 等报道了 19 个果蝇种的细菌人工染色体文库,这些文库为已报道的 12 种果蝇基因组的序列精密拼接提供帮助,对果蝇生物学的进一步发展提供巨大的帮助。

2.5 modENCODE 计划

The model organism Encyclopedia of DNA elements (modENCODE) 计划是美国国家人类基因组研究所于 2007 年启动的旨在描绘黑腹果蝇和秀丽隐杆线虫基因组的重要项目 (Celniker *et al.*, 2009)。它的目标是鉴定出这两种重要模式动物的所有的功能元件,从而为人类基因组破译工作提供帮助 (<http://www.modencode.org>)。从计划启动至今,modENCODE 计划团队已经得到了超过 700 个数据库,使果蝇基因组的注释部分提高了 3 倍之多。2010 年,他们对这些数据库进行了综合分析,对功能元件和调控回路进行鉴定。对转录序列的综合分析,他们得到了大量的数据,蛋白质编码与非编码基因总数达到 17 000 个,其中 1 938 个是以前没有被注释过的,发现了 52 914 个以前从未描写或经过改进的外显子序列。数据还覆盖了 miRNA、核染色质修饰、顺式调控元件、转录因子等多个方面,注释覆盖了基因组的 82%,绘制出一个巨大的功能调控网络,为基因的新功能预测、实验研究提供信息支持 (Roy *et al.*, 2010)。

2.6 顺式调控元件图谱

顺式调控元件(cis-regulatory elements)是一些特殊的基因组 DNA 序列,对调节基因表达具有重要作用。顺式调控元件包括了启动子(promoter)、增强子(enhancer)、沉默子(silencer)和绝缘子(insulator)等 (Riethoven, 2010)。

启动子是基因转录起始位点周围的区域,能与 RNA 聚合酶结合并形成转录复合体。在启动子结构中,具有代表性的就是 TATA-Box,它是 TATA 结合蛋白的结合位点 (Struhl *et al.*, 1998)。Hoskins 等 (2011) 以黑腹果蝇胚胎为实验材料,利用 3 种独立的试验方法 (CAGE、RACE、EST),整合分析这 3 种方法所得到的数据库来鉴定和描

绘启动子,他们用熵值来显示转录起始位点的分布,它们呈现复杂并连续的形状,利用这些数值来将启动子分为尖峰型和宽阔型,他们发现尖峰型的启动子与基因的时空表达模式具有明显的联系,同时他们还发现,利用 CAGE 法得到的数据库中,活性启动子的数量被大大高估了。启动子结构的全基因组注释为启动子的未来研究提供了重要的资源。增强子是增强启动子转录活性的 DNA 序列,它可以位于转录起始位点的上游或下游,也可以包含在外显子或内含子之间,甚至存在于基因的 5'或 3'非翻译区,其作用方式往往不受距离的限制。大多数增强子都属于非编码序列,它们在真核生物中具有高度的保守性 (Nobrega *et al.*, 2003),并且能在特定组织、不同的发育阶段特异性的调节基因的表达 (Siepel *et al.*, 2005)。沉默子是阻碍基因转录的负性调节元件,同样可以位于转录起始位点的上游或下游,以及外显子或内含子之间 (Ogbourne and Antalis, 1998)。绝缘子是特殊的顺式调节元件,它能够控制基因组内调控元件之间的联系,从而调节基因的正常表达。绝缘子插入在增强子和启动子之间,从而阻碍它们之间的联系,这种功能依赖的是绝缘子与一些蛋白(例如 CCCTC 结合蛋白 (Moon *et al.*, 2005)等)的结合。Negre 等 (2010) 利用 ChIP-chip 技术,检测了 6 种绝缘子结合蛋白的全基因组结合位点,从而获得了果蝇胚胎上的绝缘子综合图谱,他们鉴定出了超过 14 000 个假定绝缘子,这其中包括了以前已经被鉴定出来的绝缘子,这一图谱的获得对于区分基因调节单元边界和理解绝缘子功能网络具有重要的意义。

大量的调控元件全基因组鉴定分析为基因调控元件的系统注释提供了大量的有用数据 (Schuettengruber *et al.*, 2007; Zeitlinger *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2008; MacArthur *et al.*, 2009; Zinzen *et al.*, 2009; Filion *et al.*, 2010; Negre *et al.*, 2010)。作为 modENCODE 计划的一部分, Negre 等在 2011 年描绘出黑腹果蝇调控基因组图谱,通过对 313 个全基因组数据库分析,他们鉴定或预测了大量的调控元件,包括 537 个绝缘子、2 307 个新注释的启动子、14 450 个 CBP 束缚的候选顺式调控元件,7 685 个假定绝缘子,38 562 个独特的转录因子结合位点,这些结合位点中,5.2% 的结合位点与超过 8 个的转录因子结合,被

认为是高占用目的 (high occupancy target, HOT) 区域。

3 功能基因组

随着果蝇基因组测序工作的完成,果蝇基因组研究进入后基因组时代,其中,由结构基因组学向功能基因组学的转变是一个重要的方面。利用获得的大量图谱,结合蛋白质互作网络 (Yu *et al.*, 2008)、基因表达谱 (Arbeitman *et al.*, 2002)、基因互作数据库 (Stark *et al.*, 2006; Wilson *et al.*, 2008)、蛋白质保守区域 (Mulder *et al.*, 2002)、种间序列相似度分析 (Pruitt *et al.*, 2007; Johnson *et al.*, 2008) 等大量数据库,预测基因功能,从而为实验研究提供指导。果蝇功能基因的研究对器官发育、遗传综合征、癌症发生、免疫机理、生物进化、抗疾病药物开发等多方面研究提供了理论基础,近年来发展飞速。以下仅以信号通路和细胞凋亡为例进行综述。

3.1 Hh 信号通路相关基因

细胞间的联系对于生物体的正常发育有着重

要的作用。细胞通过分泌信号蛋白分子,传递给目的细胞,目的细胞接收到信号后将打开信号通路,发生一系列的细胞内处理过程,最终导致大量目的基因的表达或抑制,这些信号通路对于细胞分化、细胞增殖、细胞运动、细胞凋亡等过程都有重要的影响。整个细胞信号的传导和处理过程需要大量的基因参与完成,任何一个组分基因的异常都将导致信号通路的异常,从而影响生物个体的正常生命过程。黑腹果蝇中,主要的信号通路有 Decapentaplegic、Wingless、Hippo、Notch、JAK/STAT、JNK 和 Hedgehog (Hh) 信号通路等,在脊椎动物中也具有很高的保守性。研究各个信号通路中的相关基因,对于研究信号通路调节机制和功能基因的表达调控机制有重要作用,果蝇全基因组信息也为鉴定信号通路的靶标基因提供方便。

Hh 信号通路是果蝇发育中的重要通路之一, Hh 信号通路异常引起发育畸形或癌症。Hh 蛋白是一种分泌型的器官成形素, *hh* 基因编码的 Hh 蛋白前体进入内质网,在 Skinny Hedgehog (Ski) 酰基转移酶的作用下, N 端发生酰基化,随后发生自

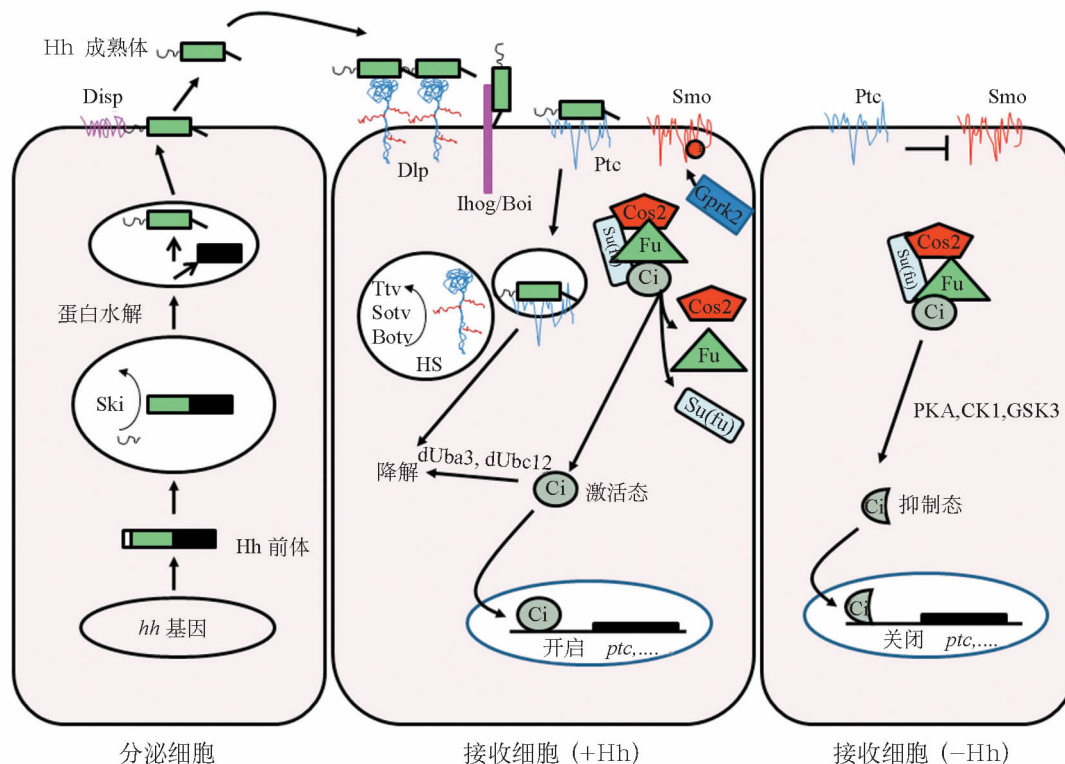


图1 Hh 信号通路示意图

Fig. 1 The schematic diagram of Hh signaling pathway

加工,C 端连接上一个胆固醇分子,经过 2 次修饰,Hh 蛋白前体形成 Hh 成熟体,在 Dispatched (Disp) 的作用下,从分泌细胞中分泌出来,随后存在于细胞外基质中。Hh 借助脂蛋白如 Dally-like 蛋白进行传递,Dally-like 蛋白经过 EXT 家族基因 (*Tout-velu*, *Sister of tout-velu*, *Brother of tout-velu*) 编码的硫酸乙酰肝素聚合酶催化进行硫酸乙酰化,Ihog (Interference hedgehog) 和 Boi (Brother of ihog) 作为辅助受体,帮助 Hh 的传递。Hh 与受体 Patched (Ptc) 结合,打开信号通路。Hh 与 Ptc 的复合体发生内在化,指导 Hh 的降解。信号通路打开,Smoothed (Smo) 受 Ptc 抑制作用被解除,发生构象改变并被磷酸化形成激活态,导致信号下游复合体 (包括 Costal 2, Fused, Suppressor of fused) 释放 Cubitus interruptus (Ci) 并形成激活态,随后激活态 Ci 进入细胞核激活 Hh 靶标基因的表达。在没有 Hh 信号的时候,Ptc 抑制 Smo 的活性,下游复合体与 Ci 结合,在磷酸酶 (PKA、CK1、GSK3) 介导下使其磷酸化,随后被分解为抑制态,进入细胞核作为转录抑制因子抑制 Hh 靶标基因的表达 (Gallet, 2011; Ingham *et al.*, 2011)。Hh 信号通路的示意图见图 1。

近年来,许多研究鉴定了调节 Hh 信号的新组分或影响者基因。2008 年,Casso 等筛选 Hh 信号通路的修饰者基因,*microtubule star* (*mts*) 和 *second mitotic wave missing* (*swm*) 基因是 Hh 信号通路的重要组分,*mts* 编码一种异源三聚体蛋白磷酸酶 (PP2A) 的催化亚单位 C,有可能调控 Hh 信号通路中需要磷酸化的过程,而 *swm* 基因负向调控 Hh 信号活力。2010 年,Camp 等研究发现,作为 Hh 信号的受体,Ihog 和 Boi 在激活 Hh 信号通路中共同起作用,单独一个基因突变并不会造成明显的影响,而且 Ihog 和 Boi 对于 Smo 的细胞膜聚集很重要。*Gprk2* 基因编码的 G 蛋白偶联受体激酶 2 参与 Hh 信号 (Molnar *et al.*, 2007),通过调节 Smo 的构象并稳定激活态构象来促进高水平的 Hh 信号 (Chen *et al.*, 2010)。Biehs 等 (2010) 鉴定出 52 个 Hh 信号假定目的基因,包括过去已经被鉴定的目的基因和新鉴定的基因,这些基因只在特定组织中表达。2011 年,Du 等通过体内 RNAi 筛选发现,*dUba3* 和 *dUbc12* 基因是 Hh 信号通路的 2 个新的调节者,它们能促进 Ci 的降解,从而负向调节 Hh 信号活力。

3.2 部分细胞凋亡相关基因

细胞凋亡 (apoptosis) 也叫细胞程序性死亡 (programmed cell death),是一种保守性的遗传调节过程,凋亡细胞可以被周围的细胞或吞噬细胞所吞噬。从果蝇到人,凋亡通路的组分也具有保守性。凋亡蛋白酶 (caspases) 是凋亡过程的主要执行者,果蝇有 7 种凋亡蛋白酶基因 (Kumar, 2007),其中比较重要的是 *dronc* (Dorstyn *et al.*, 1999)、*dcp-1* (Song *et al.*, 1997)、*DrICE* (Fraser and Evan, 1997; Fraser *et al.*, 1997) 等基因。凋亡信号不存在时,凋亡蛋白抑制者 (IAPs),例如 Diap1 (Hay *et al.*, 1995),与凋亡蛋白酶结合,抑制酶的活性 (Meier *et al.*, 2000; Zachariou *et al.*, 2003)。当受到凋亡信号刺激后,预凋亡蛋白 (pro-apoptotic proteins,例如 RHG 蛋白) 与 Diap1 结合,诱导 Diap1 降解,释放凋亡蛋白酶 (Yoo *et al.*, 2002)。释放的 Dronc 与连接者蛋白 Ark 结合形成凋亡复合体 (Dorstyn *et al.*, 1999),凋亡复合体随后激活 Dcp-1 和 DrICE,这些激活的凋亡蛋白酶引起一系列的分解反应,最终造成细胞的降解。目前鉴定的 RHG 蛋白基因有 6 种,包括 *reaper* (White *et al.*, 1994)、*hid* (Grether *et al.*, 1995)、*grim* (Chen *et al.*, 1996)、*jafrac2* (Tenev *et al.*, 2002)、*sickle* (Christich *et al.*, 2002)、*HtrA2* (Challa *et al.*, 2007)。相对于其他几种,*HtrA2* 的研究较少,最新研究显示,*HtrA2* 通过在线粒体附近使 Diap1 降解,将 Dronc 从 Diap1 中替换下来,促进细胞凋亡 (Challa *et al.*, 2007; Igaki *et al.*, 2007)。正常情况下,Diap1 与 *HtrA2* 结合促进 *HtrA2* 降解,来保护细胞 (Khan *et al.*, 2008)。*HtrA2* 作为线粒体蛋白,其他报道也证明了线粒体在细胞凋亡中的重要作用 (Khan *et al.*, 2008)。果蝇基因组编码了 4 种 IAP 家族蛋白: Diap1、Diap2、dBruce、Deterin。其中 Diap1 对果蝇最重要。对于另外一种 IAP 家族蛋白 dBruce。2007 年,Arama 等研究发现,dBruce 作为 E3 连接酶复合体的基质,是凋亡蛋白酶在精子细胞个体化过程中激活所必须的。2011 年,Dominques 和 Ryoo 报道了 dBruce 通过与 Reaper 相互反应,促进 Reaper 泛素化,来抑制细胞凋亡。细胞自我吞噬是一种保守的机制,可以降解细胞中没用的蛋白质和细胞器。Hou 等 (2008) 曾报道 dBruce 是营养物过剩时细胞自我吞噬的负向调节者。其他凋亡蛋白酶对细

胞自我吞噬也有影响。2010 年, Kim 等研究发现, 凋亡蛋白酶 Caspase 基因家族中的 Dcp-1 作为细胞凋亡的影响者, 通过遗传筛选鉴定出 72 种与 Dcp-1 凋亡蛋白酶相互作用的基因充当 Dcp-1 的修饰者, 细胞自我吞噬抑制 Dcp-1 介导的细胞凋亡, 而 *dcp-1* 正向调节细胞自体吞噬, 形成反馈调节, *dcp-1* 基因和与细胞自体吞噬有关的基因的相互影响为未来研究细胞凋亡和细胞自体吞噬的复杂关系提供帮助。

许多基因通过直接调节凋亡通路组分或间接通过信号通路(例如 JNK 通路)介导来调节细胞凋亡。最新报道显示, *Hsp60D* 基因编码热激蛋白, 在果蝇眼发育中, *Hsp60D* 蛋白帮助 Diap1 分离不同功能的凋亡蛋白酶, 来诱导细胞凋亡 (Arya and Lakhota, 2008)。STAT92E 蛋白可以提高 Diap1 的量来对抗辐射引起的细胞凋亡 (Betz *et al.*, 2008)。*emperor's thumb* 基因编码的蛋白有 2 种形态, 它们通过竞争 Diap1 来调节细胞凋亡 (Ribaya *et al.*, 2009)。这些基因都是细胞凋亡通路的直接调节者。还有一些基因异常所引起的细胞凋亡是通过 JNK 信号通路介导的。2009 年, Tiwari 和 Roy 研究发现, *Rab11* 基因对果蝇小眼细胞的正常结构和细胞存活非常重要, 当 *Rab11* 基因突变, 小眼细胞骨架被破坏, 细胞凋亡基因 *rpr*、*hid* 和 *grim* 表达量增高, 造成细胞大量死亡, 当抑制住 JNK 通路后, *Rab11* 突变眼的性状被挽救, 说明 *Rab11* 突变引起的细胞凋亡也是通过 JNK 通路来进行的。

功能基因还作用于果蝇的细胞周期调节、细胞形貌的维持与改变、疾病发生等许多生命过程。Liu 和 Finley (2010), Faradji 等 (2011) 分别鉴定了细胞周期决定因子之一周期蛋白 (Cyclins) 的 2 个新组分 CyclinY 和 Cyclin G 在调节细胞周期中的重要作用。粘着蛋白 (E-cadherin) 和肌球蛋白 (Myosin II) 等细胞形貌决定蛋白受信号通路调控调节细胞形貌的维持和改变 (Widmann and Dahmann, 2009a, 2009b)。对果蝇基因组和人类基因组的比对显示, 大约 75% 的人类致病基因在果蝇上都能找到同源基因 (Reiter *et al.*, 2001)。最新研究显示, 大量基因在疾病发生(如神经退化类疾病)中具有重要作用 (Ali *et al.*, 2011; Gouzi *et al.*, 2011; Tare *et al.*, 2011; Willecke *et al.*, 2011)。因此利用果蝇作为研究人类疾病的模式动物具有重要的意义。

4 基因功能研究技术简介

果蝇作为一种被广泛应用于生命科学研究模式动物, 借鉴并开创了大量的新实验技术, 为功能基因研究提供帮助, 包括 P 因子介导的转基因技术 (Rubin and Spradling, 1982), Gal4 - UAS 基因表达系统 (Brand and Perrimon, 1993), Flp-FRT 系统 (Xu and Rubin, 1993)、RNA 干扰技术 (Belles, 2010) 等等。技术的不断发展使传统技术不断更新, 消除实验技术限制, 并同时设计出新的技术手段, 来更好的地进行创新研究。

4.1 转座子介导的基因突变

转座子插入已经被广泛用于果蝇研究, 它们被用于制造单基因删除, 同样也能制造多基因删除。转座元件的利用, 特别是 P 因子, 使黑腹果蝇能够更好的应用于生物研究。1991 年由伯克利果蝇基因组计划建立的基因破坏计划 (Spradling *et al.*, 1999; Bellen *et al.*, 2004) 启动, 它的目的是使每一个基因都有 P 因子插入。截止目前为止, 超过三分之二的已注释蛋白编码基因已经被标记插入转座子元件, 得到大量果蝇基因突变品系 (Bellen *et al.*, 2011)。计划在实施过程中, 又引入了其他转座元件, 如 piggyBacs (Handler and Harrell, 1999)、Minos (Metaxakis *et al.*, 2005) 等。另外, Gene-TRAP 结构 (携带报告基因序列如 Enhanced GFP) 结合转座子插入到基因内含子区域, 基因编码出融合蛋白, 从而显示基因的表达、细胞分布等等。这种技术最早应用于小鼠 (Skarnes *et al.*, 1992), 随后利用转座子应用到果蝇上 (Lukacsovich *et al.*, 2001; Bonin and Mann, 2004)。

4.2 基因打靶技术

基因打靶 (gene targeting) 在 2000 年被 Rong 和 Golic 建立在果蝇体系上 (Rong and Golic, 2000), 随后应用于多种模式生物中 (Gong and Rong, 2003)。该技术综合了转座子、Flp-FRT 系统, 包含 2 种主要的实验策略: “End-out” 基因打靶、“End-in” 基因打靶 (Venken and Bellen, 2005; Wesolowska and Rong, 2010)。基因打靶反应依赖于宿主的 DNA 修复系统去交换目标基因序列与提供者序列 (Donor, 外源序列——提供与目标基因同源的基因座并携带设计好的基因组修饰), 通

过双链断裂(double strand break, DSB)的产生,同源重组感觉并指导交换的发生(Venken and Bellen, 2005)。Rong 和 Golic (2000) 引入了 I-SceI 和 I-CreI (2 种核酸限制性内切酶) 去制造双链断裂。为了改变基因打靶耗费时间和劳动密集的优点,科学家对这种方法进行不断地改进。Beumer 等 (2006) 利用序列特异性锌指核酸酶制造双链断裂来提高基因打靶的效率。Gao 等 (2008) 又整合了 phiC31 整合酶系统与 End-in 基因打靶技术,提高了实验的成功率和效率。基因打靶技术还需要进一步改进从而更好的为基因功能研究做贡献。

4.3 功能基因时空表达技术

利用 Heat-shock 启动子、Gal4-UAS 系统、Flp-FRT 系统等遗传工具对基因进行时空表达控制是目前研究基因功能的重要手段。

Heat-shock 启动子通过在时间上控制转基因表达,能够帮助研究人员定义发育或生理框架。低温条件下,转基因表达被抑制,高温条件下,转基因开始表达,在时间上控制温度的变化来控制转基因的表达,从而实现表达时间上的控制(Wilder, 2000)。Gal4-UAS 系统发现于酵母中(Brand and Perrimon, 1993),在果蝇中,将携带 Gal4 基因片段的 P 因子插入到果蝇内源组织特异性增强子中,形成果蝇转基因品系,目的基因克隆到 UAS 基因片段的下游后插入到另外的果蝇基因组中,形成另外一种转基因品系,两种品系杂交后,后代携带完整的 Gal4-UAS 系统,从而实现目的基因在果蝇特定组织内的表达控制(McGuire *et al.*, 2004)。Flp-FRT 系统利用 Flp 重组酶特异性识别 FRT 位点的特性,制造镶嵌克隆细胞。这些系统还可以有机地结合起来,设计复杂的果蝇基因型。另外一种时空上同时控制的有效手段是 TARGET (temporal and regional gene expression targeting) 系统, Gal80 蛋白与 Gal4 蛋白结合从而抑制 Gal4 蛋白与 UAS 位点的特异性结合,目前 Gal80 蛋白变种 Gal80ts (Gal80 temperature-sensitive) 被加入到 Gal4-UAS 系统中, Gal80ts 是一种温度敏感性蛋白,低温下 (18℃), Gal80ts 具有活性,从而抑制 Gal4-UAS 系统,高温下 (29℃), Gal80ts 失去活性, Gal4-UAS 系统打开,表达目的基因(McGuire *et al.*, 2004)。

4.4 其他技术

TILLING (targeting-induced local lesions in genomes) 技术用于快速高效的鉴定出特定基因的单核苷酸变化(Henikoff *et al.*, 2004; Stemple, 2004), 最早被应用在筛选拟南芥突变体中(McCallum *et al.*, 2000), 近年来被广泛用于多种生物体中(Wienholds *et al.*, 2002; Perry *et al.*, 2003; Smits *et al.*, 2004; Till *et al.*, 2004), 包括黑腹果蝇(Bentley *et al.*, 2000)。P 因子介导的转基因技术允许外源 DNA 被有效的导入果蝇基因组中(Rubin and Spradling, 1982), 但是它有很多限制,如不能携带大于 50 kb 的 DNA 片段,不能有效的操作大的 DNA 片段的插入等等。phiC31 位点特异性整合酶介导的转基因技术改善了这种限制,它发现于噬菌体中,特异性的识别 attP 位点,进行重组,有效的将外源 DNA (包括大的 DNA 片段) 整合到基因组当中(Venken *et al.*, 2009)。

5 展望

黑腹果蝇已经成为一种在生物医学各领域中最受重视的模式动物之一。从摩尔根首次利用果蝇进行遗传学研究开始,果蝇学者已经 4 次荣获诺贝尔奖。1933 年的诺贝尔生理学或医学奖授予了摩尔根,他发现了果蝇染色体的遗传性。1946 年,摩尔根的学生再获此殊荣,米勒发现使用 X 射线可诱发果蝇的高频率突变。1995 年,因为在胚胎早期发育的遗传控制领域的发现,美国的刘易斯和维绍斯与德国的福尔哈德一起分享了这一年的诺贝尔生理或医学奖。2004 年,美国科学家阿克塞尔和巴克因发现了气味分子受体并揭示了嗅觉系统的组织,获此殊荣。今年,又有 3 位科学家因在免疫学方面的发现获奖。其中博伊特勒和霍夫曼揭示了身体免疫应答过程的第 1 步,发现了能识别微生物并激活先天性免疫的受体蛋白质。斯坦曼则发现了免疫应答过程的下一步,免疫系统中的树突状细胞可激活并控制获得性免疫的功能,即将微生物清除。果蝇研究在生命科学领域取得了如此之大的成就,截止 2011 年 10 月 24 日 10 点,以“*Drosophila*”为关键词,在 Pubmed 上可检索到 76 226 篇学术论文。果蝇基因组学和功能基因的研究正在飞速发展,必将为生物医学农业等基础与应用科学提供越来越多的帮助。

黑腹果蝇基因组的测序成功证明了鸟枪法测

序是一种有效地可行地针对真核生物测序的手段。到目前为止,共有 88 种昆虫已完成或正在进行的基因组测序都是采用的鸟枪法 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/leuks.cgi>)。果蝇功能基因研究借助于多种实验技术的帮助,取得了巨大的进步。这些技术的首次建立与应用有些是来源于非果蝇生物,但被很好的引入到果蝇研究中去,并取得巨大成功,而有些技术也从果蝇中引入到了其他昆虫中,如转基因技术,目前除了果蝇以外的转基因昆虫有家蚕、赤拟谷盗和埃及伊蚊。家蚕最早由日本科学家制造出转基因品系 (Imamura *et al.*, 2003)。最近, Gal4 - UAS 系统也被成功导入家蚕,并利用 Gal4 变种提供基因表达效率 (Kobayashi *et al.*, 2011)。该系统也被应用到赤拟谷盗和埃及伊蚊当中,对功能基因的表达模式等研究有巨大帮助 (Schinko *et al.*, 2010; Kokoza and Raikhel, 2011)。相信转基因技术将被广泛运用到更多的昆虫研究中,为应用科学做更多的贡献,包括本实验室正在进行的迁飞性农业害虫如东亚飞蝗和小地老虎的转基因研究等。

参考文献 (References)

- Adams MD, Celniker SE, Holt RA, Evans CA, Gocayne JD, Amanatides PG, Scherer SE, Li PW, Hoskins RA, Galle RF, George RA, Lewis SE, Richards S, Ashburner M, Henderson SN, Sutton GG, Wortman JR, Yandell MD, Zhang Q, Chen LX, Brandon RC, Rogers YHC, Blazej RG, Champe M, Pfeiffer BD, Wan KH, Doyle C, Baxter EG, Helt G, Nelson CR, Miklos GLG, Abril JF, Agbayani A, An HJ, Andrews-Pfannkoch C, Baldwin D, Ballew RM, Basu A, Baxendale J, Bayraktaroglu L, Beasley EM, Beeson KY, Benos PV, Berman BP, Bhandari D, Bolshakov S, Borkova D, Botchan MR, Bouck J, Brokstein P, Brottier P, Burtis KC, Busam DA, Butler H, Cadieu E, Center A, Chandra I, Cherry JM, Cawley S, Dahlke C, Davenport LB, Davies A, de Pablos B, Delcher A, Deng ZM, Mays AD, Dew I, Dietz SM, Dodson K, Doup LE, Downes M, Dugan-Rocha S, Dunkov BC, Dunn P, Durbin KJ, Evangelista CC, Ferraz C, Ferriera S, Fleischmann W, Fosler C, Gabrielian AE, Garg NS, Gelbart WM, Glasser K, Glodek A, Gong FC, Gorrell JH, Gu ZP, Guan P, Harris M, Harris NL, Harvey D, Heiman TJ, Hernandez JR, Houck J, Hostin D, Houston DA, Howland TJ, Wei MH, Ibegwam C, Jalali M, Kalush F, Karpen GH, Ke ZX, Kennison JA, Ketchum KA, Kimmel BE, Kodira CD, Kraft C, Kravitz S, Kulp D, Lai ZW, Lasko P, Lei YD, Levitsky AA, Li JY, Li ZY, Liang Y, Lin XY, Liu XJ, Mattei B, McIntosh TC, McLeod MP, McPherson D, Merkulov G, Milshina NV, Mobarry C, Morris J, Moshrefi A, Mount SM, Moy M, Murphy B, Murphy L, Muzny DM, Nelson DL, Nelson DR, Nelson KA, Nixon K, Nusskern DR, Pacleb JM, Palazzolo M, Pittman GS, Pan S, Pollard J, Puri V, Reese MG, Reinert K, Remington K, Saunders RDC, Scheeler F, Shen H, Shue BC, Siden-Kiamos I, Simpson M, Skupski MP, Smith T, Spier E, Spradling AC, Stapleton M, Strong R, Sun E, Svirkas R, Tector C, Turner R, Venter E, Wang AHH, Wang X, Wang ZY, Wassarman DA, Weinstock GM, Weissenbach J, Williams SM, Woodage T, Worley KC, Wu D, Yang S, Yao QA, Ye J, Yeh RF, Zaveri JS, Zhan M, Zhang GG, Zhao Q, Zheng LS, Zheng XQH, Zhong FN, Zhong WY, Zhou XJ, Zhu SP, Zhu XH, Smith HO, Gibbs RA, Myers EW, Rubin GM, Venter JC, 2000. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science*, 287 (5461):2185—2195.
- Ali YO, Ruan K, Zhai RG, 2011. NMNAT suppresses Tau-induced neurodegeneration by promoting clearance of hyperphosphorylated Tau oligomers in a *Drosophila* model of tauopathy. *Hum. Mol. Genet.*, Oct 13. Epub ahead of print.
- Arama E, Bader M, Rieckhof GE, Steller H, 2007. A ubiquitin ligase complex regulates caspase activation during sperm differentiation in *Drosophila*. *PLoS Biol.*, 5 (10): e251.
- Arbeitman MN, Furlong EE, Imam F, Johnson E, Null BH, Baker BS, Krasnow MA, Scott MP, Davis RW, White KP, 2002. Gene expression during the life cycle of *Drosophila melanogaster*. *Science*, 297 (5590):2270—2275.
- Arya R, Lakhota SC, 2008. Hsp60D is essential for caspase-mediated induced apoptosis in *Drosophila melanogaster*. *Cell Stress Chaperon.*, 13 (4):509—526.
- Bellen HJ, Levis RW, He YC, Carlson JW, Evans-Holm M, Bae E, Kim J, Metaxakis A, Savakis C, Schulze KL, Hoskins RA, Spradling AC, 2011. The *Drosophila* gene disruption project: progress using transposons with distinctive site specificities. *Genetics*, 188 (3):731—743.
- Bellen HJ, Levis RW, Liao G, He Y, Carlson JW, Tsang G, Evans-Holm M, Hiesinger PR, Schulze KL, Rubin GM, Hoskins RA, Spradling AC, 2004. The BDGP gene disruption project: single transposon insertions associated with 40% of *Drosophila* genes. *Genetics*, 167 (2):761—

- 781.
- Belles X, 2010. Beyond *Drosophila*: RNAi in vivo and functional genomics in insects. *Annu. Rev. Entomol.*, 55: 111—128.
- Bentley A, MacLennan B, Calvo J, Dearolf CR, 2000. Targeted recovery of mutations in *Drosophila*. *Genetics*, 156 (3):1169—1173.
- Betz A, Ryoo HD, Steller H, Darnell JE, 2008. STAT92E is a positive regulator of *Drosophila* inhibitor of apoptosis 1 (DIAP1) and protects against radiation-induced apoptosis. *PNAS*, 105(37):13805—13810.
- Beumer K, Bhattacharyya G, Bibikova M, Trautman JK, Carroll D, 2006. Efficient gene targeting in *Drosophila* with zinc-finger nucleases. *Genetics*, 172(4):2391—2403.
- Biehs B, Kechris K, Liu SM, Kornberg TB, 2010. Hedgehog targets in the *Drosophila* embryo and the mechanisms that generate tissue-specific outputs of Hedgehog signaling. *Development*, 137(22):3887—3898.
- Biemont C, Vieira C, 2006. Genetics - Junk DNA as an evolutionary force. *Nature*, 443(7111):521—524.
- Bonin CP, Mann RS, 2004. A piggyBac transposon gene trap for the analysis of gene expression and function in *Drosophila*. *Genetics*, 167(4):1801—1811.
- Brand AH, Perrimon N, 1993. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*, 118(2):401—415.
- Camp D, Currie K, Labbe A, van Meyel DJ, Charron F, 2010. Ihog and Boi are essential for Hedgehog signaling in *Drosophila*. *Neural. Dev.*, 5:28.
- Casso DJ, Liu S, Iwaki DD, Ogden SK, Kornberg TB, 2008. A screen for modifiers of hedgehog signaling in *Drosophila melanogaster* identifies swm and mts. *Genetics*, 178(3):1399—1413.
- Celniker SE, Dillon LA, Gerstein MB, Gunsalus KC, Henikoff S, Karpen GH, Kellis M, Lai EC, Lieb JD, MacAlpine DM, Micklem G, Piano F, Snyder M, Stein L, White KP, Waterston RH, 2009. Unlocking the secrets of the genome. *Nature*, 459:927—930.
- Challa M, Malladi S, Pellock BJ, Dresnek D, Varadarajan S, Yin YW, White K, Bratton SB, 2007. *Drosophila omi*, a mitochondrial-localized IAP antagonist and proapoptotic serine protease. *EMBO J.*, 26(13):3144—3156.
- Chen P, Nordstrom W, Gish B, Abrams JM, 1996. grim, a novel cell death gene in *Drosophila*. *Genes Dev.*, 10(14):1773—1782.
- Chen Y, Li S, Tong C, Zhao Y, Wang B, Liu Y, Jia J, Jiang J, 2010. G protein-coupled receptor kinase 2 promotes high-level Hedgehog signaling by regulating the active state of Smo through kinase-dependent and kinase-independent mechanisms in *Drosophila*. *Genes Dev.*, 24(18):2054—2067.
- Christich A, Kauppila S, Chen P, Sogame N, Ho SI, Abrams JM, 2002. The damage-responsive *Drosophila* gene sickle encodes a novel IAP binding protein similar to but distinct from reaper, grim, and hid. *Curr. Biol.*, 12(2):137—140.
- Clark AG, Eisen MB, Smith DR, Bergman CM, Oliver B, Markow TA, Kaufman TC, Kellis M, Gelbart W, Iyer VN, Pollard DA, Sackton TB, Larracuenta AM, Singh ND, Abad JP, Abt DN, Adryan B, Aguade M, Akashi H, Anderson WW, Aquadro CF, Ardell DH, Arguello R, Artieri CG, Barbash DA, Barker D, Barsanti P, Batterham P, Batzoglou S, Begun D, Bhutkar A, Blanco E, Bosak SA, Bradley RK, Brand AD, Brent MR, Brooks AN, Brown RH, Butlin RK, Caggese C, Calvi BR, Bernardo de Carvalho A, Caspi A, Castrezana S, Celniker SE, Chang JL, Chapple C, Chatterji S, Chinwalla A, Civetta A, Clifton SW, Comeron JM, Costello JC, Coyne JA, Daub J, David RG, Delcher AL, Delehaunty K, Do CB, Ebling H, Edwards K, Eickbush T, Evans JD, Filipinski A, Findeiss S, Freyhult E, Fulton L, Fulton R, Garcia AC, Gardiner A, Garfield DA, Garvin BE, Gibson G, Gilbert D, Gnerre S, Godfrey J, Good R, Gotea V, Gravely B, Greenberg AJ, Griffiths-Jones S, Gross S, Guigo R, Gustafson EA, Haerty W, Hahn MW, Halligan DL, Halpern AL, Halter GM, Han MV, Heger A, Hillier L, Hinrichs AS, Holmes I, Hoskins RA, Hubisz MJ, Hultmark D, Huntley MA, Jaffe DB, Jagadeeshan S, Jeck WR, Johnson J, Jones CD, Jordan WC, Karpen GH, Kataoka E, Keightley PD, Kheradpour P, Kirkness EF, Koerich LB, Kristiansen K, Kudrna D, Kulathinal RJ, Kumar S, Kwok R, Lander E, Langley CH, Lapoint R, Lazzaro BP, Lee SJ, Levesque L, Li R, Lin CF, Lin MF, Lindblad-Toh K, Llopart A, Long M, Low L, Lozovsky E, Lu J, Luo M, Machado CA, Makalowski W, Marzo M, Matsuda M, Matzkin L, McAllister B, McBride CS, McKernan B, McKernan K, Mendez-Lago M, Minx P, Mollenhauer MU, Montooth K, Mount SM, Mu X, Myers E, Negre B, Newfeld S, Nielsen R, Noor MA, O'Grady P, Pachter L, Papaceit M, Parisi MJ, Parisi M, Parts L, Pedersen JS, Pesole G, Phillippy AM, Ponting CP, Pop M, Porcelli D, Powell JR, Prohaska S, Pruitt K, Puig M, Quesneville H, Ram KR, Rand D, Rasmussen MD, Reed LK, Reenan R, Reily A, Remington KA, Rieger TT, Ritchie MG, Robin C, Rogers YH, Rohde

- C, Rozas J, Rubenfield MJ, Ruiz A, Russo S, Salzberg SL, Sanchez-Gracia A, Saranga DJ, Sato H, Schaeffer SW, Schatz MC, Schlenke T, Schwartz R, Segarra C, Singh RS, Sirot L, Sirota M, Sisneros NB, Smith CD, Smith TF, Spieth J, Stage DE, Stark A, Stephan W, Strausberg RL, Strempel S, Sturgill D, Sutton G, Sutton GG, Tao W, Teichmann S, Tobar YN, Tomimura Y, Tsolas JM, Valente VL, Venter E, Venter JC, Vicario S, Vieira FG, Vilella AJ, Villasante A, Walenz B, Wang J, Wasserman M, Watts T, Wilson D, Wilson RK, Wing RA, Wolfner MF, Wong A, Wong GK, Wu CI, Wu G, Yamamoto D, Yang HP, Yang SP, Yorke JA, Yoshida K, Zdobnov E, Zhang P, Zhang Y, Zimin AV, Baldwin J, Abdouelleil A, Abdulkadir J, Abebe A, Abera B, Abreu J, Acer SC, Aftuck L, Alexander A, An P, Anderson E, Anderson S, Arachi H, Azer M, Bachantsang P, Barry A, Bayul T, Berlin A, Bessette D, Bloom T, Blye J, Boguslavskiy L, Bonnet C, Boukhgalter B, Bourzgui I, Brown A, Cahill P, Channer S, Cheshatsang Y, Chuda L, Citroen M, Collymore A, Cooke P, Costello M, D'Aco K, Daza R, De Haan G, DeGray S, DeMaso C, Dhargay N, Dooley K, Dooley E, Doricent M, Dorje P, Dorjee K, Dupes A, Elong R, Falk J, Farina A, Faro S, Ferguson D, Fisher S, Foley CD, Franke A, Friedrich D, Gadbois L, Gearin G, Gearin CR, Giannoukos G, Goode T, Graham J, Grandbois E, Grewal S, Gyaltzen K, Hafez N, Hagos B, Hall J, Henson C, Hollinger A, Honan T, Huard MD, Hughes L, Hurhula B, Husby ME, Kamat A, Kanga B, Kashin S, Khazanovich D, Kisner P, Lance K, Lara M, Lee W, Lennon N, Letendre F, LeVine R, Lipovsky A, Liu X, Liu J, Liu S, Lokyitsang T, Lokyitsang Y, Lubonja R, Lui A, MacDonald P, Magnisalis V, Maru K, Matthews C, McCusker W, McDonough S, Mehta T, Meldrim J, Meneus L, Mihai O, Mihalev A, Mihova T, Mittelman R, Mlenga V, Montmayeur A, Mulrain L, Navidi A, Naylor J, Negash T, Nguyen T, Nguyen N, Nicol R, Norbu C, Norbu N, Novod N, O'Neill B, Osman S, Markiewicz E, Oyono OL, Patti C, Phunkhang P, Pierre F, Priest M, Raghuraman S, Rege F, Reyes R, Rise C, Rogov P, Ross K, Ryan E, Settipalli S, Shea T, Sherpa N, Shi L, Shih D, Sparrow T, Spaulding J, Stalker J, Stange-Thomann N, Stavropoulos S, Stone C, Strader C, Tesfaye S, Thomson T, Thoulutsang Y, Thoulutsang D, Topham K, Topping I, Tsamla T, Vassiliev H, Vo A, Wangchuk T, Wangdi T, Weiland M, Wilkinson J, Wilson A, Yadav S, Young G, Yu Q, Zembek L, Zhong D, Zimmer A, Zwirko Z, Alvarez P, Brockman W, Butler J, Chin C, Grabherr M, Kleber M, Mauceli E, MacCallum I, 2007. Evolution of genes and genomes on the *Drosophila* phylogeny. *Nature*, 450(7167):203—218.
- Deloger M, Cavalli FM, Lerat E, Biemont C, Sagot MF, Vieira C, 2009. Identification of expressed transposable element insertions in the sequenced genome of *Drosophila melanogaster*. *Gene*, 439(1/2):55—62.
- Domingues C, Ryoo HD, 2011. *Drosophila* BRUCE inhibits apoptosis through non-lysine ubiquitination of the IAP-antagonist REAPER. *Cell Death Differ.*, Sep 2. doi: 10.1038/cdd.2011.116. Epub ahead of print.
- Dorstyn L, Colussi PA, Quinn LM, Richardson H, Kumar S, 1999. DRONC, an ecdysone-inducible *Drosophila* caspase. *PNAS*, 96(8):4307—4312.
- Drysdale R, 2003. The *Drosophila melanogaster* genome sequencing and annotation projects: a status report. *Brief. Funct. Genomic. Proteomic.*, 2(2):128—134.
- Du J, Zhang JZ, Su Y, Liu M, Ospina JK, Yang SY, Zhu AJ, 2011. In Vivo RNAi screen reveals neddylation genes as novel regulators of hedgehog signaling. *PLoS ONE*, 6(9):e24168.
- Faradji F, Bloyer S, Dardalhon-Cumenal D, Randsholt NB, Peronnet F, 2011. *Drosophila melanogaster* Cyclin G coordinates cell growth and cell proliferation. *Cell Cycle*, 10(5):805—818.
- Filion GJ, van Bommel JG, Braunschweig U, Talhout W, Kind J, Ward LD, Brugman W, de Castro IJ, Kerkhoven RM, Bussemaker HJ, van Steensel B, 2010. Systematic protein location mapping reveals five principal chromatin types in *Drosophila* cells. *Cell*, 143(2):212—224.
- Fontanillas P, Hartl DL, Reuter M, 2007. Genome organization and gene expression shape the transposable element distribution in the *Drosophila melanogaster* euchromatin. *PLoS Genet.*, 3(11):e210.
- Fraser AG, Evan GI, 1997. Identification of a *Drosophila melanogaster* ICE/CED-3-related protease, drICE. *EMBO J.*, 16(10):2805—2813.
- Fraser AG, McCarthy NJ, Evan GI, 1997. DrICE is an essential caspase required for apoptotic activity in *Drosophila* cells. *EMBO J.*, 16(20):6192—6199.
- Gallet A, 2011. Hedgehog morphogen: from secretion to reception. *Trends Cell Biol.*, 21(4):238—246.
- Gao G, McMahon C, Chen J, Rong YS, 2008. A powerful method combining homologous recombination and site-specific recombination for targeted mutagenesis in *Drosophila*. *PNAS*, 105(37):13999—14004.
- Gong M, Rong YS, 2003. Targeting multi-cellular organisms.

- Curr. Opin. Genet. Dev.*, 13(2):215—220.
- Gouzi JY, Moressis A, Walker JA, Apostolopoulou AA, Palmer RH, Bernardis A, Skoulakis EM, 2011. The receptor tyrosine kinase alk controls neurofibromin functions in *Drosophila* growth and learning. *PLoS Genet.*, 7(9): e1002281.
- Grether ME, Abrams JM, Agapite J, White K, Steller H, 1995. The head involution defective gene of *Drosophila melanogaster* functions in programmed cell death. *Genes Dev.*, 9(14):1694—1708.
- Handler AM, Harrell RA, 1999. Germline transformation of *Drosophila melanogaster* with the piggyBac transposon vector. *Insect Mol. Biol.*, 8(4):449—457.
- Hay BA, Wassarman DA, Rubin GM, 1995. *Drosophila* homologs of baculovirus inhibitor of apoptosis proteins function to block cell death. *Cell*, 83(7):1253—1262.
- Henikoff S, Till BJ, Comai L, 2004. TILLING. Traditional mutagenesis meets functional genomics. *Plant Physiol.*, 135(2):630—636.
- Hoskins RA, Landolin JM, Brown JB, Sandler JE, Takahashi H, Lassmann T, Yu C, Booth BW, Zhang D, Wan KH, Yang L, Boley N, Andrews J, Kaufman TC, Graveley BR, Bickel PJ, Carninci P, Carlson JW, Celniker SE, 2011. Genome-wide analysis of promoter architecture in *Drosophila melanogaster*. *Genome Res.*, 21(2):182—192.
- Hou YC, Chittaranjan S, Barbosa SG, McCall K, Gorski SM, 2008. Effector caspase Dcp-1 and IAP protein Bruce regulate starvation-induced autophagy during *Drosophila melanogaster* oogenesis. *J. Cell Biol.*, 182(6):1127—1139.
- Igaki T, Suzuki Y, Tokushige N, Aonuma H, Takahashi R, Miura M, 2007. Evolution of mitochondrial cell death pathway: Proapoptotic role of HtrA2/Omi in *Drosophila*. *Biochem. Biophys Res. Commun.*, 356(4):993—997.
- Imamura M, Nakai J, Inoue S, Quan GX, Kanda T, Tamura T, 2003. Targeted gene expression using the GAL4/UAS system in the silkworm *Bombyx mori*. *Genetics*, 165(3): 1329—1340.
- Ingham PW, Nakano Y, Seger C, 2011. Mechanisms and functions of Hedgehog signalling across the metazoa. *Nat. Rev. Genet.*, 12(6):393—406.
- Johnson M, Zaretskaya I, Raytselis Y, Merezhuik Y, McGinnis S, Madden TL, 2008. NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic. Acids. Res.*, 36 (Web Server issue):W5—9.
- Kaminker JS, Bergman CM, Kronmiller B, Carlson J, Svirskaas R, Patel S, Frise E, Wheeler DA, Lewis SE, Rubin GM, Ashburner M, Celniker SE, 2002. The transposable elements of the *Drosophila melanogaster* euchromatin: a genomics perspective. *Genome Biol.*, 3(12):RESEARCH0084.
- Karlin S, Bergman A, Gentles AJ, 2001. Genomics: Annotation of the *Drosophila* genome. *Nature*, 411(6835): 259—260.
- Khan FS, Fujioka M, Datta P, Fernandes-Alnemri T, Jaynes JB, Alnemri ES, 2008. The interaction of DIAP1 with dOmi/HtrA2 regulates cell death in *Drosophila*. *Cell Death Differ.*, 15(6):1073—1083.
- Kim YI, Ryu T, Lee J, Heo YS, Ahnn J, Lee SJ, Yoo O, 2010. A genetic screen for modifiers of *Drosophila* caspase Dcp-1 reveals caspase involvement in autophagy and novel caspase-related genes. *BMC Cell Biol.*, 11:9.
- Kobayashi I, Kojima K, Uchino K, Sezutsu H, Iizuka T, Tatematsu KI, Yonemura N, Tanaka H, Yamakawa M, Ogura E, Kamachi Y, Tamura T, 2011. An efficient binary system for gene expression in the silkworm, *Bombyx mori*, using Gal4 variants. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 76(4):195—210.
- Kokoza VA, Raikhel AS, 2011. Targeted gene expression in the transgenic *Aedes aegypti* using the binary Gal4-UAS system. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 41(8):637—644.
- Kumar S, 2007. Caspase function in programmed cell death. *Cell Death Differ.*, 14(1):32—43.
- Li XY, MacArthur S, Bourgon R, Nix D, Pollard DA, Iyer VN, Hechmer A, Simirenko L, Stapleton M, Luengo Hendriks CL, Chu HC, Ogawa N, Inwood W, Sementchenko V, Beaton A, Weiszmann R, Celniker SE, Knowles DW, Gingeras T, Speed TP, Eisen MB, Biggin MD, 2008. Transcription factors bind thousands of active and inactive regions in the *Drosophila* blastoderm. *PLoS Biol.*, 6(2):e27.
- Liu DM, Finley RL, 2010. Cyclin Y is a novel conserved cyclin essential for development in *Drosophila*. *Genetics*, 184(4):1025—1232.
- Lukacsovich T, Asztalos Z, Awano W, Baba K, Kondo S, Niwa S, Yamamoto D, 2001. Dual-tagging gene trap of novel genes in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 157(2): 727—742.
- MacArthur S, Li XY, Li J, Brown JB, Chu HC, Zeng L, Grondona BP, Hechmer A, Simirenko L, Keranen SV, Knowles DW, Stapleton M, Bickel P, Biggin MD, Eisen MB, 2009. Developmental roles of 21 *Drosophila* transcription factors are determined by quantitative differences in binding to an overlapping set of thousands of genomic regions. *Genome Biol.*, 10(7):R80.

- Markow TA, O'Grady PM, 2007. *Drosophila* biology in the genomic age. *Genetics*, 177(3):1269—1276.
- McCallum CM, Comai L, Greene EA, Henikoff S, 2000. Targeted screening for induced mutations. *Nat. Biotechnol.*, 18(4):455—457.
- McGuire SE, Roman G, Davis RL, 2004. Gene expression systems in *Drosophila*: a synthesis of time and space. *Trends Genet.*, 20(8):384—391.
- Meier P, Silke J, Leever SJ, Evan GI, 2000. The *Drosophila* caspase DRONC is regulated by DIAP1. *EMBO J.*, 19(4):598—611.
- Metaxakis A, Oehler S, Klinakis A, Savakis C, 2005. Minos as a genetic and genomic tool in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 171(2):571—581.
- Misra S, Crosby MA, Mungall CJ, Matthews BB, Campbell KS, Hradscky P, Huang Y, Kaminker JS, Millburn GH, Prochnik SE, Smith CD, Tupy JL, Whitfield EJ, Bayraktaroglu L, Berman BP, Bettencourt BR, Celniker SE, de Grey AD, Drysdale RA, Harris NL, Richter J, Russo S, Schroeder AJ, Shu SQ, Stapleton M, Yamada C, Ashburner M, Gelbart WM, Rubin GM, Lewis SE, 2002. Annotation of the *Drosophila melanogaster* euchromatic genome: a systematic review. *Genome Biol.*, 3(12):RESEARCH0083.
- Molnar C, Holguin H, Mayor F, Jr., Ruiz-Gomez A, de Celis JF, 2007. The G protein-coupled receptor regulatory kinase GPRK2 participates in Hedgehog signaling in *Drosophila*. *PNAS*, 104(19):7963—7968.
- Moon H, Filippova G, Loukinov D, Pugacheva E, Chen Q, Smith ST, Munhall A, Grewe B, Bartkuhn M, Arnold R, Burke LJ, Renkawitz-Pohl R, Ohlsson R, Zhou JM, Renkawitz R, Lobanenko V, 2005. CTCF is conserved from *Drosophila* to humans and confers enhancer blocking of the Fab-8 insulator. *EMBO Rep.*, 6(2):165—170.
- Mulder NJ, Apweiler R, Attwood TK, Bairoch A, Bateman A, Binns D, Biswas M, Bradley P, Bork P, Bucher P, Copley R, Courcelle E, Durbin R, Falquet L, Fleischmann W, Gouzy J, Griffith-Jones S, Haft D, Hermjakob H, Hulo N, Kahn D, Kanapin A, Krestyaninova M, Lopez R, Letunic I, Orchard S, Pagni M, Peyruc D, Ponting CP, Servant F, Sigrist CJ, 2002. InterPro: an integrated documentation resource for protein families, domains and functional sites. *Brief Bioinform.*, 3(3):225—235.
- Negre N, Brown CD, Ma L, Bristow CA, Miller SW, Wagner U, Kheradpour P, Eaton ML, Loriaux P, Sealfon R, Li Z, Ishii H, Spokony RF, Chen J, Hwang L, Cheng C, Auburn RP, Davis MB, Domanus M, Shah PK, Morrison CA, Zieba J, Suchy S, Senderowicz L, Victorsen A, Bild NA, Grundstad AJ, Hanley D, MacAlpine DM, Mannervik M, Venken K, Bellen H, White R, Gerstein M, Russell S, Grossman RL, Ren B, Posakony JW, Kellis M, White KP, 2011. A cis-regulatory map of the *Drosophila* genome. *Nature*, 471(7339):527—531.
- Negre N, Brown CD, Shah PK, Kheradpour P, Morrison CA, Henikoff JG, Feng X, Ahmad K, Russell S, White RA, Stein L, Henikoff S, Kellis M, White KP, 2010. A comprehensive map of insulator elements for the *Drosophila* genome. *PLoS Genet.*, 6(1):e1000814.
- Nobrega MA, Ovcharenko I, Afzal V, Rubin EM, 2003. Scanning human gene deserts for long-range enhancers. *Science*, 302(5644):413.
- Ogbourne S, Antalis TM, 1998. Transcriptional control and the role of silencers in transcriptional regulation in eukaryotes. *Biochem. J.*, 331(Pt 1):1—14.
- Perry JA, Wang TL, Welham TJ, Gardner S, Pike JM, Yoshida S, Parniske M, 2003. A TILLING reverse genetics tool and a web-accessible collection of mutants of the legume *Lotus japonicus*. *Plant Physiol.*, 131(3):866—871.
- Pruitt KD, Tatusova T, Maglott DR, 2007. NCBI reference sequences (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins. *Nucleic Acids Res.*, 35(Database issue):D61—65.
- Reiter LT, Potocki L, Chien S, Gribskov M, Bier E, 2001. A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*. *Genome Res.*, 11(6):1114—1125.
- Ribaya JP, Ranmuthu M, Copeland J, Boyarskiy S, Blair AP, Hay B, Laski FA, 2009. The deubiquitinase emperor's thumb is a regulator of apoptosis in *Drosophila*. *Dev. Biol.*, 329(1):25—35.
- Riethoven JJ, 2010. Regulatory regions in DNA: promoters, enhancers, silencers, and insulators. *Methods Mol. Biol.*, 674:33—42.
- Rong YS, Golic KG, 2000. Gene targeting by homologous recombination in *Drosophila*. *Science*, 288(5473):2013—2018.
- Roy S, Ernst J, Kharchenko PV, Kheradpour P, Negre N, Eaton ML, Landolin JM, Bristow CA, Ma L, Lin MF, Washietl S, Arshinoff BI, Ay F, Meyer PE, Robine N, Washington NL, Di Stefano L, Berezikov E, Brown CD, Candeias R, Carlson JW, Carr A, Jungreis I, Marbach D, Sealfon R, Tolstorukov MY, Will S, Alekseyenko AA, Artieri C, Booth BW, Brooks AN, Dai Q, Davis CA, Duff

- MO, Feng X, Gorchakov AA, Gu T, Henikoff JG, Kapranov P, Li R, MacAlpine HK, Malone J, Minoda A, Nordman J, Okamura K, Perry M, Powell SK, Riddle NC, Sakai A, Samsonova A, Sandler JE, Schwartz YB, Sher N, Spokony R, Sturgill D, van Baren M, Wan KH, Yang L, Yu C, Feingold E, Good P, Guyer M, Lowdon R, Ahmad K, Andrews J, Berger B, Brenner SE, Brent MR, Cherbas L, Elgin SC, Gingeras TR, Grossman R, Hoskins RA, Kaufman TC, Kent W, Kuroda MI, Orr-Weaver T, Perrimon N, Pirrotta V, Posakony JW, Ren B, Russell S, Cherbas P, Graveley BR, Lewis S, Micklem G, Oliver B, Park PJ, Celniker SE, Henikoff S, Karpen GH, Lai EC, MacAlpine DM, Stein LD, White KP, Kellis M, 2010. Identification of functional elements and regulatory circuits by *Drosophila* modENCODE. *Science*, 330(6012):1787—1797.
- Rubin GM, Spradling AC, 1982. Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science*, 218(4570):348—353.
- Schinko JB, Weber M, Viktorinova I, Kiupakis A, Averof M, Klingler M, Wimmer EA, Bucher G, 2010. Functionality of the GAL4/UAS system in *Tribolium* requires the use of endogenous core promoters. *BMC Dev. Biol.*, 10:53.
- Schuettengruber B, Chourrout D, Vervoort M, Leblanc B, Cavalli G, 2007. Genome regulation by polycomb and trithorax proteins. *Cell*, 128(4):735—745.
- Siepel A, Bejerano G, Pedersen JS, Hinrichs AS, Hou M, Rosenbloom K, Clawson H, Spieth J, Hillier LW, Richards S, Weinstock GM, Wilson RK, Gibbs RA, Kent WJ, Miller W, Haussler D, 2005. Evolutionarily conserved elements in vertebrate, insect, worm, and yeast genomes. *Genome Res.*, 15(8):1034—1050.
- Skarnes WC, Auerbach BA, Joyner AL, 1992. A gene trap approach in mouse embryonic stem cells: the lacZ reported is activated by splicing, reflects endogenous gene expression, and is mutagenic in mice. *Genes Dev.*, 6(6):903—918.
- Smith CD, Shu S, Mungall CJ, Karpen GH, 2007. The release 5.1 annotation of *Drosophila melanogaster* heterochromatin. *Science*, 316(5831):1586—1591.
- Smits BM, Mudde J, Plasterk RH, Cuppen E, 2004. Target-selected mutagenesis of the rat. *Genomics*, 83(2):332—334.
- Song X, Goicoechea JL, Ammiraju JS, Luo M, He R, Lin J, Lee SJ, Sisneros N, Watts T, Kudrna DA, Golser W, Ashley E, Collura K, Braidotti M, Yu Y, Matzkin LM, McAllister BF, Markow TA, Wing RA, 2011. The 19 genomes of *Drosophila*: a BAC library resource for genus-wide and genome-scale comparative evolutionary research. *Genetics*, 187(4):1023—1030.
- Song Z, McCall K, Steller H, 1997. DCP-1, a *Drosophila* cell death protease essential for development. *Science*, 275(5299):536—540.
- Spradling AC, Stern D, Beaton A, Rhem EJ, Laverty T, Mozden N, Misra S, Rubin GM, 1999. The Berkeley *Drosophila* genome project gene disruption project: Single P-element insertions mutating 25% of vital *Drosophila* genes. *Genetics*, 153(1):135—177.
- Stark C, Breitkreutz BJ, Reguly T, Boucher L, Breitkreutz A, Tyers M, 2006. BioGRID: a general repository for interaction datasets. *Nucleic Acids Res.*, 34 (Database issue):535—539.
- Stemple DL, 2004. TILLING—a high-throughput harvest for functional genomics. *Nat. Rev. Genet.*, 5(2):145—150.
- Struhl K, Kadosh D, Keaveney M, Kuras L, Moqtaderi Z, 1998. Activation and repression mechanisms in yeast. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 63:413—421.
- Tare M, Modi RM, Nainaparampil JJ, Puli OR, Bedi S, Fernandez-Funez P, Kango-Singh M, Singh A, 2011. Activation of JNK signaling mediates amyloid- β -dependent cell death. *PLoS ONE*, 6(9):e24361.
- Tenev T, Zachariou A, Wilson R, Paul A, Meier P, 2002. Jafra2 is an IAP antagonist that promotes cell death by liberating Dronc from DIAP1. *EMBO J.*, 21(19):5118—5129.
- Till BJ, Reynolds SH, Weil C, Springer N, Burtner C, Young K, Bowers E, Codomo CA, Enns LC, Odden AR, Greene EA, Comai L, Henikoff S, 2004. Discovery of induced point mutations in maize genes by TILLING. *BMC Plant Biol.*, 4:12.
- Tiwari AK, Roy JK, 2009. Mutation in Rab11 results in abnormal organization of ommatidial cells and activation of JNK signaling in the *Drosophila* eye. *Eur. J. Cell Biol.*, 88(8):445—460.
- Venken KJ, Bellen HJ, 2005. Emerging technologies for gene manipulation in *Drosophila melanogaster*. *Nat. Rev. Genet.*, 6(3):167—178.
- Venken KJ, Carlson JW, Schulze KL, Pan H, He Y, Spokony R, Wan KH, Koriabine M, de Jong PJ, White KP, Bellen HJ, Hoskins RA, 2009. Versatile P[acman] BAC libraries for transgenesis studies in *Drosophila melanogaster*. *Nat. Methods.*, 6(6):431—434.
- Wesolowska N, Rong YS, 2010. The past, present and future of gene targeting in *Drosophila*. *Fly (Austin)*, 4(1):53—

- 59.
- Wessler SR, 2006. Transposable elements and the evolution of eukaryotic genomes. *PNAS*, 103(47):17600—17601.
- White K, Grether ME, Abrams JM, Young L, Farrell K, Steller H, 1994. Genetic control of programmed cell death in *Drosophila*. *Science*, 264(5159):677—683.
- Widmann TJ, Dahmann C, 2009a. Wingless signaling and the control of cell shape in *Drosophila* wing imaginal discs. *Dev. Biol.*, 334(1):161—173.
- Widmann TJ, Dahmann C, 2009b. Dpp signaling promotes the cuboidal-to-columnar shape transition of *Drosophila* wing disc epithelia by regulating Rho1. *J. Cell Sci.*, 122 (Pt 9):1362—1373.
- Wienholds E, Schulte-Merker S, Walderich B, Plasterk RH, 2002. Target-selected inactivation of the zebrafish *rag1* gene. *Science*, 297(5578):99—102.
- Wilder EL, 2000. Ectopic expression in *Drosophila*. *Methods Mol. Biol.*, 137:9—14.
- Willecke M, Toggweiler J, Basler K, 2011. Loss of PI3K blocks cell-cycle progression in a *Drosophila* tumor model. *Oncogene*, 30(39):4067—4074.
- Wilson RJ, Goodman JL, Strelets VB, 2008. FlyBase: integration and improvements to query tools. *Nucleic. Acids Res.*, 36 (Database issue):D588—593.
- Xu T, Rubin GM, 1993. Analysis of genetic mosaics in developing and adult *Drosophila* tissues. *Development*, 117 (4):1223—1237.
- Yoo SJ, Huh JR, Muro I, Yu H, Wang LJ, Wang SL, Feldman RMR, Clem RJ, Muller HAJ, Hay BA, 2002. Hid, Rpr and Grim negatively regulate DIAP1 levels through distinct mechanisms. *Nat. Cell Biol.*, 4 (6): 416—424.
- Yu J, Pacifico S, Liu G, Finley Jr R, 2008. DroID: the *Drosophila* interactions database, a comprehensive resource for annotated gene and protein interactions. *BMC Genomics*, 9:461.
- Zachariou A, Tenev T, Goyal L, Agapite J, Steller H, Meier P, 2003. IAP-antagonists exhibit non-redundant modes of action through differential DIAP1 binding. *EMBO J.*, 22 (24):6642—6652.
- Zeitlinger J, Stark A, Kellis M, Hong JW, Nechaev S, Adelman K, Levine M, Young RA, 2007. RNA polymerase stalling at developmental control genes in the *Drosophila melanogaster* embryo. *Nat. Genet.*, 39(12):1512—1516.
- Zinzen RP, Girardot C, Gagneur J, Braun M, Furlong EEM, 2009. Combinatorial binding predicts spatio-temporal cis-regulatory activity. *Nature*, 462(7269):65—70.