

УДК 575.16

***DROSOPHILA MELANOGASTER* КАК МОДЕЛЬ ГЕНЕТИКИ РАЗВИТИЯ: СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ**

© 2020 г. Л. Н. Нефедова*

Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова,
Москва, 119234 Россия

*e-mail: lidia_nefedova@mail.ru

Поступила в редакцию 14.02.2020 г.

После доработки 26.02.2020 г.

Принята к публикации 29.02.2020 г.

Плодовая мушка *Drosophila melanogaster* уже более ста лет успешно служит универсальной моделью в различных генетических исследованиях, в том числе в исследованиях генетического контроля индивидуального развития. К настоящему времени для дрозофилы разработан целый арсенал методов обратной генетики, позволяющих довольно легко манипулировать с ее геномом, что позволяет считать дрозофилу одной из самых мощных моделей генетики развития. В обзоре рассмотрены основные современные методы исследования экспрессии и функции генов у дрозофилы и перспективы их применения.

Ключевые слова: дрозофила, генетика развития, модель, экспрессия генов

DOI: 10.31857/S0475145020040059

ВВЕДЕНИЕ

Плодовая мушка *Drosophila melanogaster* уже более ста лет успешно служит универсальной моделью в различных генетических исследованиях. За это время на дрозофиле был сделан целый ряд знаменательных открытий, касающихся структуры гена, генетического сцепления, механизмов мутагенеза и рекомбинации, генетической нестабильности и микроэволюционных процессов в популяциях. Дрозофила как модель помогла сделать важнейшие фундаментальные открытия и в области биологии развития: с ее помощью были расшифрованы базовые консервативные генетические механизмы, регулирующие отдельные этапы индивидуального развития.

Для поиска генов, контролирующих развитие, долгое время применяли классический подход: индукция мутаций с помощью химического или радиационного мутагенеза и анализ мутантного фенотипа методами гибридологического анализа, с последующим тщательным генетическим картированием генов (Riggleman et al., 1989). Около 20 лет назад геном *D. melanogaster* был полностью секвенирован и аннотирован. Это сделало возможным применение стратегии обратной генетики в генетическом анализе развития дрозофилы. Одним из основных подходов исследования функции гена методами обратной генетики является его направленная инактивация с последующим изучением мутантного фенотипа. В

2000-е годы была предложена система инактивации генов у дрозофилы, основанная на гомологичной рекомбинации (Rong et al., 2000). Затем были усовершенствованы методы выключения генов с использованием систем транспозонного мутагенеза (Nagarkar-Jaiswal et al., 2015), внедрена методика выключения и редактирования генов CRISPR-Cas (Ewen-Campen et al., 2017). Полное выключение генов, контролирующих онтогенез, часто сопровождается летальным фенотипом, что затрудняет исследование функций таких генов. Проблему позволяют преодолевать системы для инактивации генов, которую можно осуществлять направленно в специфических тканях или даже в определенных индивидуальных клетках (Theodosiou et al., 1998; Lee, Luo, 2001; Ryder, Russell, 2003). Разработаны также системы для исследования ткане- и возрастоспецифичной экспрессии отдельных генов (McGuire et al., 2004).

В настоящее время *D. melanogaster* — один из наиболее изученных видов живых организмов. А благодаря огромному арсеналу методов, позволяющих довольно легко манипулировать с ее геномом, дрозофила является одной из самых мощных биологических моделей. В обзоре будут рассмотрены основные современные методы исследования экспрессии и функции генов у дрозофилы.

ТРАНСПОЗОННЫЙ МУТАГЕНЕЗ

В 1980-е годы Рубиным и Спрадлингом была разработана методика транспозонного мутагенеза для дрозофилы с использованием Р-элемента (Rubin, Spradling, 1982). Применение этой методики позволило получать мутанты, несущие инсерции транспозона в произвольном месте генома, в том числе внутри генов. Разработке методики способствовало открытие явления, которое носит название гибридного (гонадального) дисгенеза. Гибридный дисгенез проявляется у потомства в виде повышенной частоты транспозиции мобильных элементов, что сопровождается генными и хромосомными мутациями, рекомбинацией у самцов, а также стерильностью гибридов (Kidwell, 1985). Гибридный дисгенез был описан не только для Р-элемента, но и для некоторых других транспозонов и ретротранспозонов. Скрещивания могут быть дисгенными только в том случае, если самцы несут транспозиционно активный мобильный элемент, а самки — нет. Это явление объясняется сегодня тем, что самки, имеющие в геноме копии определенного мобильного элемента, приобретают защитные механизмы, основанные на рiРНК-интерференции и подавляющие его транспозицию в тканях яичников (Duc et al., 2019).

В экспериментах Рубина и Спрадлинга на основе плазмидного вектора была получена конструкция, содержащая Р-элемент, у которого 5'- и 3'-концевые повторы, необходимые для узнавания транспозазой, были сохранены, а центральная часть (включая ген транспозазы) заменена на ген *rosy*⁺. Эту конструкцию инъецировали в ранние эмбрионы дрозофилы совместно с плазмидой-помощницей, экспрессирующей транспозазу, или несущую полноразмерный Р-элемент (рис. 1). Для инъекций использовали мутантные по гену *rosy* эмбрионы, в геномах которых отсутствовал Р-элемент. В данном эксперименте 8% инъецированных эмбрионов развились в фертильных имаго и 39% из них дали потомство с фенотипом *rosy*⁺, т.е. несли в геноме инсерцию транспозона. Далее проводили отбор мутантов по интересующему фенотипу и осуществляли поиск локализации инсерции транспозона. Таким образом, был разработан эффективный для своего времени метод исследования функции генов дрозофилы путем отбора мутантов после ненаправленного транспозонного мутагенеза.

Этот метод получил дальнейшее развитие, и в ходе реализации проекта “Геном дрозофилы” (Berkeley Drosophila Genome Project, BDGP) была поставлена задача инактивировать каждый ген дрозофилы путем введения Р-элемента. В рамках этой задачи было получено более 30000 линий мух, несущих транспозон в различных участках генома. Более 6000 линий были отобраны для пополнения коллекции линий дрозофил центра

Блумингтона (Bloomington Stock Center). В совокупности около 40% генов дрозофилы на сегодняшний день содержат вставки Р-элемента в кодирующей или регуляторной части гена (Bellen et al., 2004).

Позже были разработаны аналогичные системы транспозонного мутагенеза, основанные на использовании транспозонов *Minos D. hydei* (Loukeris et al., 1995) и *piggyBack* чешуекрылых (Lobo et al., 1999). Оба транспозона не встречаются в геноме *D. melanogaster*, а, значит, используемые для трансгенеза линии *D. melanogaster* априори окажутся для них дисгенными.

МУТАГЕНЕЗ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИСТЕМЫ GAL4/UAS: УПРАВЛЕНИЕ ЭКСПРЕССИЕЙ ГЕНА

Метод транспозонного мутагенеза получил широкое распространение и стал использоваться не только для выключения генов, но и для управления экспрессией клонированных генов. Транспозонный мутагенез с использованием системы GAL4/UAS был впервые применен в работе (Brand, Perrimon, 1993) для исследования функции гена *even-skipped*, участвующего в контроле сегментации у дрозофилы. Система состоит из двух конструкций, одна из которых содержит ген, кодирующий дрожжевой транскрипционный активатор GAL4, а другая — исследуемый ген, в 5'-регуляторную часть которого введен сайт связывания GAL4 — энхансер UAS (CGG-N11-CCG). Конструкции работают в двух разных трансгенных линиях мух. Одна линия — драйвер — экспрессирует GAL4 под управлением геномного энхансера, другая линия содержит исследуемый ген под регуляцией UAS (рис. 2). При скрещивании этих двух линий у гибридного потомства происходит активация исследуемого гена, которую можно осуществлять во всех клетках организма (например, воздействуя повышенной температурой, если экспрессия *GAL4* находится под контролем промотора гена теплового шока) или тканеспецифично (в том случае если *GAL4* экспрессируется в определенном типе клеток или ткани под тканеспецифичным промотором). Показано, что продукт дрожжевого гена *GAL4* не оказывает значительного влияния на фенотип мух. К настоящему времени получена коллекция линий, которые экспрессируют *GAL4* в разных тканях; эти линии так и называют — GAL4-линии. К ним относятся GMR-GAL4 (экспрессия в постмитотических клетках глаза), CG7077-GAL4 (экспрессия в пигментных клетках), sNPF-GAL4 (экспрессия в клетках центральной нервной системы), elav-GAL4 (экспрессия в нейронах мозга), e22c-GAL4 (экспрессия в фолликулярных стволовых клетках) и многие другие (более полный список см. на сайтах <http://flystocks.bio.indiana>, <http://flybase.org/>).

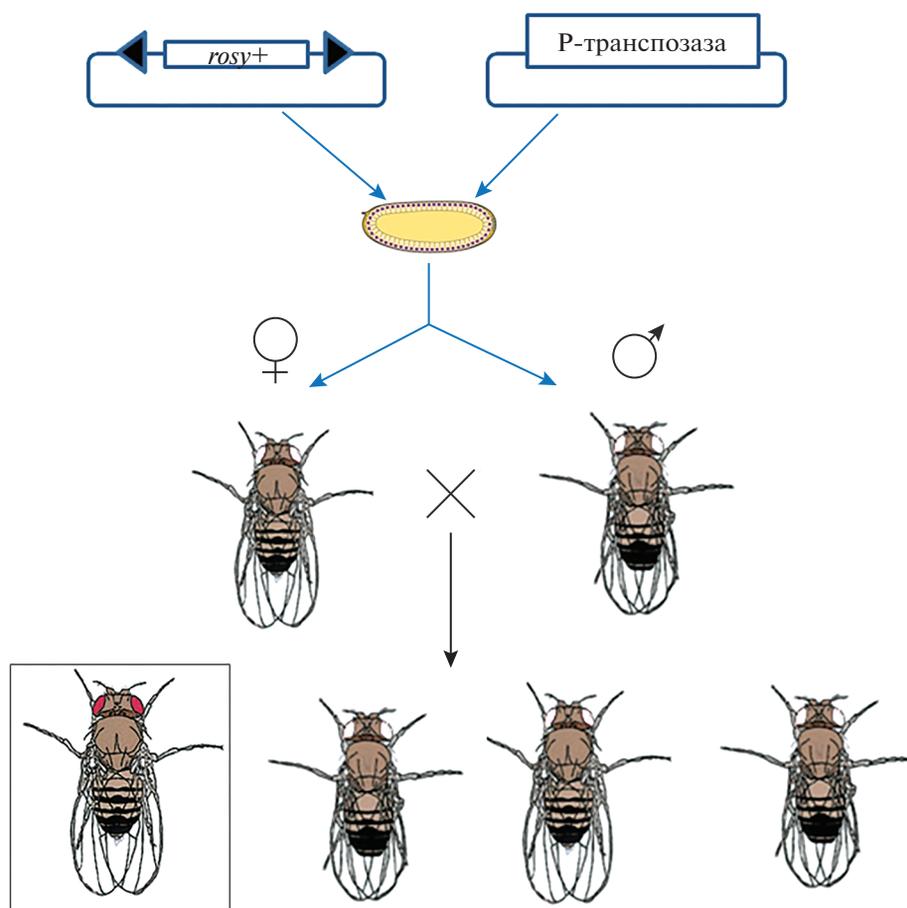


Рис. 1. Транспозонный мутагенез с использованием P-элемента. Метод основан на коинъекции ранних эмбрионов с генотипом *white* конструкциями с геном *rosy*⁺, фланкированным концами P-элемента, и с геном P-транспозазы. Полученные после инъекции химерные особи после скрещивания с некоторой вероятностью дают потомков с розовыми глазами (трансгенный потомок выделен рамкой).

Применение системы GAL4/UAS открывает широкие перспективы для управления экспрессией генов, поскольку она позволяет избирательно (клеточно- или тканеспецифично) активировать или подавлять транскрипцию исследуемого гена. Последнее возможно при использовании линий-помощниц, экспрессирующих репрессор GAL4 – GAL80.

МУТАГЕНЕЗ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКИХ РЕКОМБИНАЗ: ГЕННЫЕ И БЕЛКОВЫЕ ЛОВУШКИ

Прорывным этапом обратной генетики дрозофилы стала разработка метода сайт-специфической интеграции заданной последовательности в геном. Эта методика первоначально предназначалась для генома мыши (Branda, Dumeski, 2004). Для дрозофилы были адаптированы системы Flp-FRT (Golic, Golic, 1996), PhiC31 (Groth et al., 2004) и Cre-Lox (Nakazawa et al., 2012).

Система рекомбинации Cre-Lox бактериофага P1 состоит из фермента рекомбиназы Cre, которая узнает две короткие последовательности-мишени, LoxP, и осуществляет рекомбинацию между ними. Система рекомбинации Flp-FRT из 2-микронной плазмиды дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* аналогична Cre-Lox, и включает рекомбиназу (флиппазу) Flp, которая осуществляет рекомбинацию между сайтами-мишенями, FRT. На основе этих двух систем получены трансгенные линии дрозофилы, несущие ген рекомбиназы и сайты узнавания (рис. 3).

Сравнительный анализ эффективности “нокаута” генов с использованием рекомбиназ Flp и Cre у *D. melanogaster* был проведен в работе (Frickenhaus et al., 2015). Авторы использовали системы GAL4/UAS-Flp и GAL4/UAS-Cre для специфической экспрессии соответствующих рекомбиназ в нейронах и в мышцах с целью инактивации гена *cabeza*. Авторы пришли к выводу, что как инструмент “нокаута” рекомбиназа Flp более эффективна, чем рекомбиназа Cre, что они связали с недостаточной экспрессией Cre в

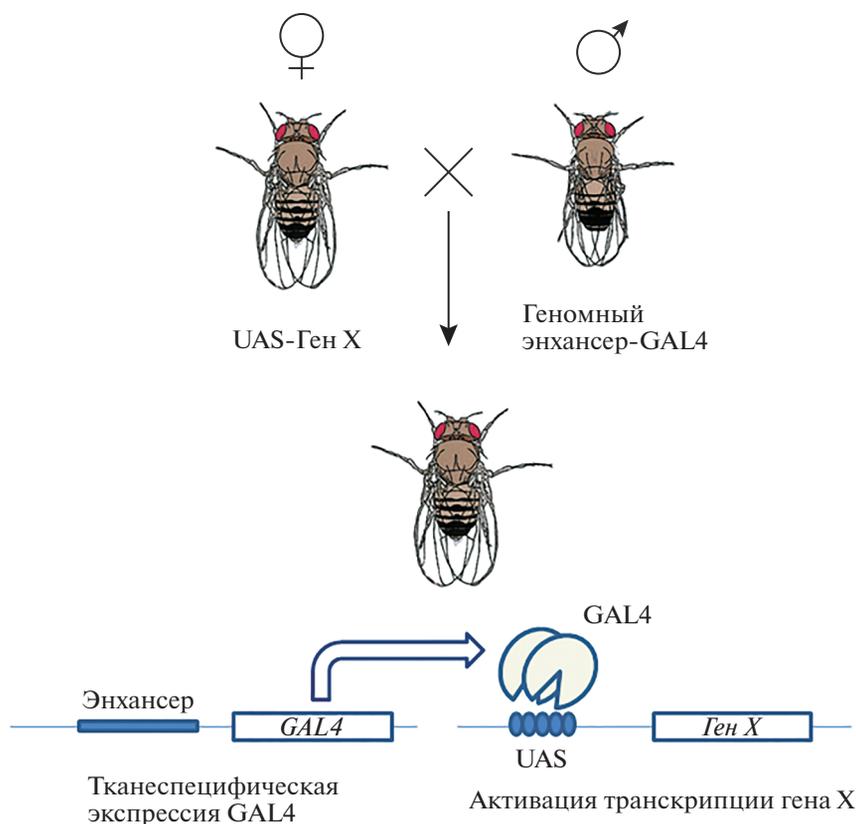


Рис. 2. Метод управления экспрессией гена с использованием системы GAL4/UAS. При скрещивании линий, одна из которых содержит в геноме исследуемый ген X под контролем дрожжевого энхансера UAS, а другая – GAL4 под контролем геномного энхансера, у гибридов происходит активация транскрипции исследуемого гена. Вместо последовательности гена X в геном линии UAS может быть интегрирована конструкция для подавления экспрессии гена X путем РНК-интерференции.

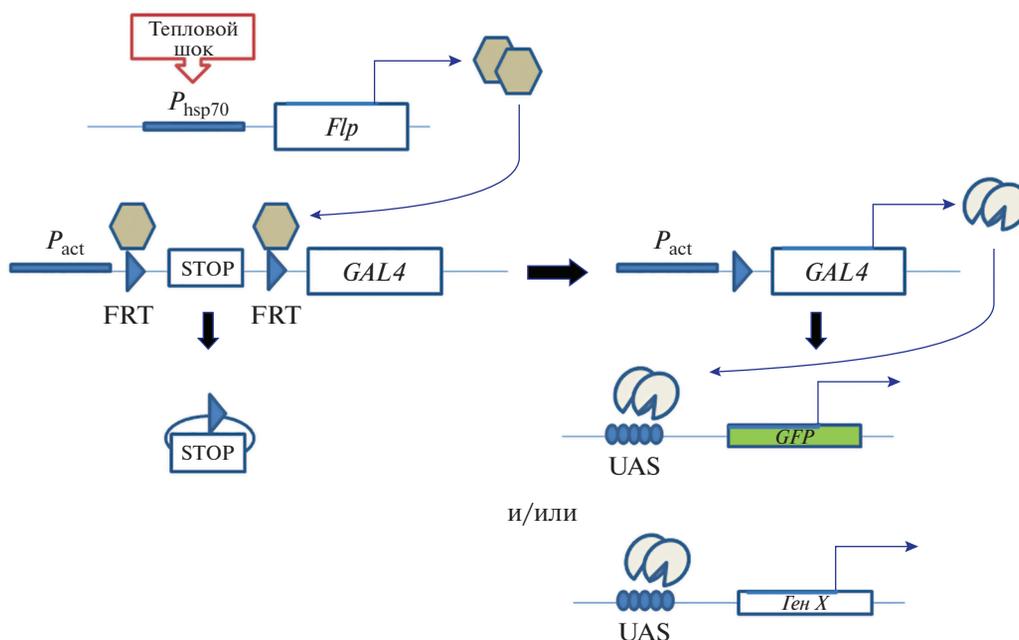


Рис. 3. Один из возможных подходов управления экспрессией генов с использованием системы рекомбинации Flp/FRT. В данном примере флипаза Flp находится под контролем промотора гена теплового шока, индукция экспрессии Flp приводит к рекомбинации по сайтам FRT, что активирует экспрессию гена GAL4, находящуюся под контролем промотора гена актина. Продукт GAL4, в свою очередь, запускает экспрессию гена флуоресцентного белка и/или исследуемого гена X.

исследуемых клетках. Кроме того, авторы обнаружили токсичность белка *Cte* для дрозофилы, что не наблюдается при использовании белка *Flp*.

Система рекомбинации *Flp-FRT* была использована для получения хромосомных перестроек у дрозофилы. Усилия проектов консорциумов *DrosDel* (Bloomington Drosophila Stock Center) и *Exelixis* были направлены на получение делеционных мутаций по нескольким тысячам генов. Для получения перестроек была использована коллекция линий, несущих инсерции *FRT*-сайтов, между которыми проводили массовые скрещивания. Так, в ходе реализации проекта *DrosDel* была получена библиотека делеционных мутаций, в совокупности покрывающих около 80% генома (Ryder et al., 2007). Всего в ходе реализации проектов *DrosDel* и *Exelixis* было получено более 500000 делеций, размером от 1 пн до 1 млн пн.

Система рекомбинации фага *phiC31* оказалась особенно полезным инструментом для получения линий трансгенных мух, поскольку наиболее эффективно позволяет вставлять различные трансгенные последовательности в один и тот же сайт в геноме (Groth et al., 2004; Bischof et al., 2007). *PhiC31* кодирует интегразу, обеспечивающую рекомбинацию между сайтами *attP* и *attB*. При рекомбинации между сайтами *attP* и *attB* образуются гибридные сайты *attL* и *attR*, которые ферментом не узнаются. К настоящему времени получен набор линий, содержащих сайты посадки интегразы по всему геному и доступных в различных коллекционных центрах (Knapp et al., 2015). Недавно была получена мутантная интеграса *phiC31*, которая способна осуществлять не только интеграцию, но и эксцизию (вырезание) по сайтам узнавания, что полезно для получения комбинаций различных трансгенов в пределах одного гена.

С использованием рекомбинации *phiC31* был разработан метод обмена кассет, опосредованного рекомбиназой (recombinase-mediated cassette exchange, RMCE) (Bateman et al., 2006). При использовании такого подхода сайт геномной посадки, содержащий маркерный ген, фланкированный сайтами *attP*, может быть заменен любой другой последовательностью ДНК через плазмиду, содержащую интересующий ген, фланкированный сайтами *attB* (рис. 4а). Важно отметить, что эта технология позволяет интегрировать в геном даже немаркированные конструкции в дрозофилу, т.е. даже те, в которых отсутствуют функциональные гены, а содержатся регуляторные или служебные последовательности (например, множественные сайты клонирования).

Одной из наиболее полезных и гибких стратегий, основанных на транспозонах и системе RMCE, является система *MiMIC* (Minos-mediated integration cassette) (Venken et al., 2011). Конструкция

MiMIC содержит транспозон *Minos*, фланкированный двумя инвертированными сайтами узнавания рекомбиназы *phiC31*, *attP*, внутрь которого вставлены кассеты с генной ловушкой – геном зеленого флуоресцентного белка *GFP* – и селективным маркером *yellow⁺*, а непосредственно перед ними локализованы акцепторный сайт сплайсинга и стоп-кодоны в трех рамках считывания. Сайты *attP* позволяют заменить внутреннюю последовательность транспозона любой другой последовательностью через опосредованный рекомбиназой обмен кассет (RMCE) (рис. 4б). Вставка конструкции *MiMIC* в правильной ориентации в интрон кодирующего гена будет способствовать трансляции усеченного белка из-за наличия акцептора сплайсинга и стоп-кодонов, таким образом, вставка будет действовать в качестве генной ловушки. Уникальность системы *MiMIC* – это возможность вводить в состав последовательностей исследуемого гена регуляторные гены, такой как *GAL4* или *Flp*, и функциональные репортеры, например *GFP* (рис. 4в).

В работе (Venken et al., 2011) была получена коллекция из более чем 6000 инсерций *MiMIC* в регуляторные последовательности и интроны генов. Примерно 2000 генов в настоящее время имеют *MiMIC*-вставки в интронах, но применение технологии CRISPR (см. ниже) для введения вставок *MiMIC* в геном, как предполагается, может сильно расширить возможности метода.

Метод белковой ловушки (protein trapping) основан на применении конструкций *MiMIC*, которые несут последовательность флуоресцентного белка, фланкированную SA и DS. Если такая конструкция встраивается в интрон, репортер (обычно ген *GFP*) попадает в одну рамку считывания с “захваченным” геном (рис. 4в). Этот подход был успешно использован у ряда модельных организмов, в том числе у дрозофилы, для которой созданы коллекции линий мух, экспрессирующих *GFP* в составе конструкции *MiMIC*, встроенных в интроны разных генов.

GFP-ловушки в основном используются для изучения характера экспрессии захваченных генов или клеточной локализация их белковых продуктов. *GFP*-ловушка также может быть использована для подавления посредством РНК-интерференции транскрипции гена, слитых в одной рамке с *GFP*. Этот метод называют “тег-опосредованной потерей функции” (tag-mediated loss-of-function), он устраняет основные недостатки классического подхода нокдауна с использованием РНК-интерференции, в котором ген-специфические последовательности являются мишенями для малых РНК. В работе (Neumüller et al., 2012) было проведено исследование материнского эффекта нескольких генов (*Spt6*, *Cp1*, *Pabp2* и *par-6*) в эмбриогенезе путем тканеспецифичного

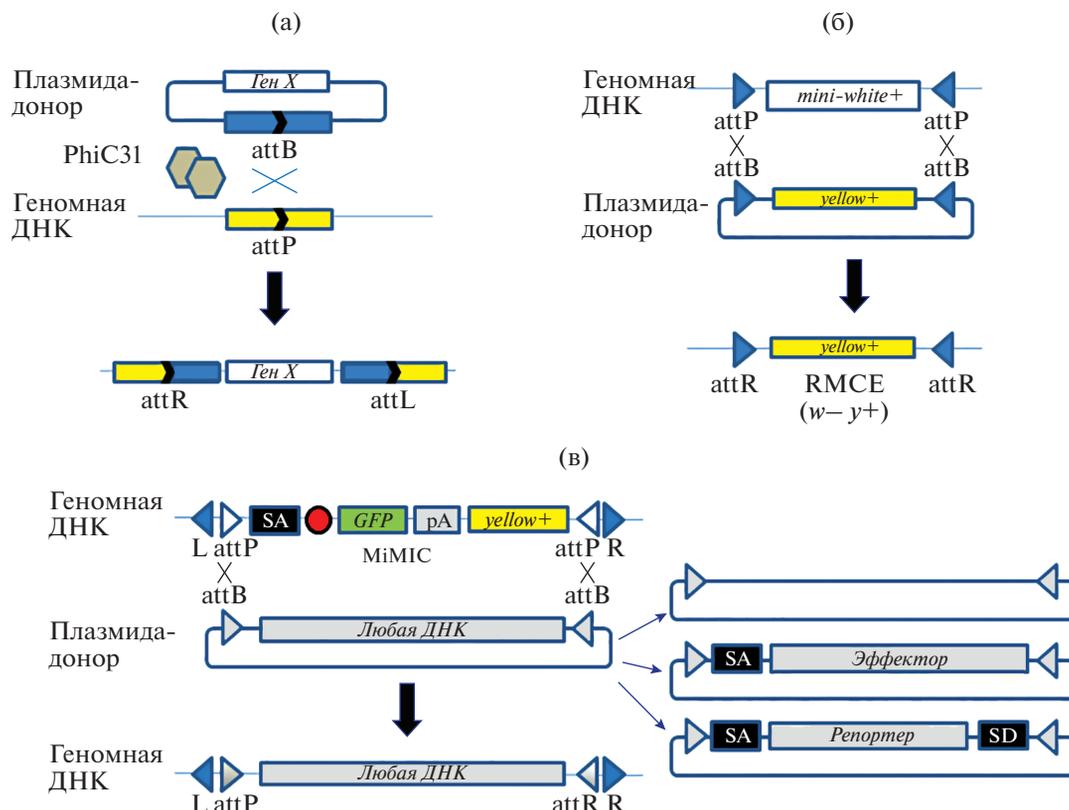


Рис. 4. Методы управления экспрессией гена с использованием системы рекомбинации PhiC31. (а) Ген X может быть встроен в геном, в определенный сайт которого предварительно встроены сайты узнавания PhiC31 – attP. Для запуска процесса рекомбинации используют систему скрещиваний линий мух, несущих ген рекомбиназы PhiC31 и сайты ее узнавания, и плазмиду-донор трансгена. (б) Схема замещения гена *mini-white+* на ген *yellow* с использованием донорной плазмиды – метод RCME. (в) Система MiMIC. Конструкция состоит из двух инвертированных повторов транспозона Minos (L и R), двух инвертированных сайтов attP PhiC31 (P), кассеты-ловушки для гена, состоящей из акцепторного сайта сплайсинга (SA), за которым следуют стоп-кодоны в трех рамках считывания (красный круг), ген GFP с сигналом полиаденилирования (pA) и ген *yellow*⁺. Последовательность между сайтами attP может быть заменена через RCME, в результате чего два образуются гибридные сайты attR. Плазмидой-донором для RCME может служить плазмиды, состоящая из полилинкерного сайта для клонирования, плазмиды с геном-эффектором (например, *GAL4*), слитым с SA, или плазмиды-“белковая ловушка”, состоящая из репортера (например, *GFP*), фланкированного SA и донорным сайтом сплайсинга (SD).

выключения вышеописанным методом транскрипции генов в клетках зародышевой линии.

РНК-ИНТЕРФЕРЕНЦИЯ: НОКДАУН ГЕНА

РНК-интерференция (РНКи) является эндогенным клеточным механизмом, запускаемым двухцепочечной РНК (дцРНК), которая приводит к деградации гомологичных ей РНК и подавлению экспрессии гена на посттранскрипционном уровне (Ameres, Zamore, 2013). Механизм РНКи был впервые обнаружен в *Caenorhabditis elegans*, но потом был открыт в клетках многих эукариот: у животных, растений и грибов.

Детальное исследование механизмов РНКи позволило разработать ряд подходов, использующих РНКи для направленного выключения экспрессии гена – нокдауна гена. РНКи как механизм подавления экспрессии генов у дрозофилы

был впервые применен путем прямой инъекции дцРНК в ранние эмбрионы для исследования роли генов *Frizzled* и *Frizzled2* в ходе раннего развития эмбрионов (Kennerdell, Carthew, 1998). Позже были получены коллекции линий мух, экспрессирующие короткие дцРНК-шпильки (shRNA), комплементарные определенным генам. дцРНК-шпильки экспрессируется под контролем системы Gal4/UAS, позволяя направленно подавлять экспрессию гена у гибридов. Коллекция трансгенных линий для нокдауна на сегодняшний день охватывает около 12000 генов, что составляет более 80% всех известных белок-кодирующих генов у дрозофилы. Коллекции доступны в Гарвардском центре – Harvard Drosophila RNAi Screening Center (DRSC) (Ramadan et al., 2007) и Венском центре – Vienna Drosophila RNAi Center (VDRC) (Dietzl et al., 2007).

РНКи приводит к направленной деградации определенной мРНК в цитоплазме, процесс, который как правило, приводит к снижению экспрессии гена, но не к полному отсутствию экспрессии гена. Недавний анализ эффективности нокдауна гена методом РНК и показал, что 90% линий *in vivo* демонстрируют остаточную экспрессию выключаемых генов (25% или больше) (Perkins et al., 2015). Следовательно, РНКи обычно приводит к гипоморфному фенотипу, при котором количество продукта, кодируемого геном, значительно уменьшается, но не отсутствует полностью. Это может быть преимуществом, например, для изучения жизненно важных генов, полное выключение которых летально для организма. Однако в некоторых случаях, гипоморфный фенотип мешает исследованию, например, в том случае, если ген в норме экспрессируется на низком или очень низком уровне. Особенно сложно управлять экспрессией генов во время индивидуального развития, когда экспрессия будет сильно зависеть от возраста.

РНКи обычно приводит к нокдауну с примерно одинаковой эффективностью во всех GAL4-экспрессирующих клетках, хотя в некоторых случаях могут наблюдаться мозаичные эффекты (Bosch et al., 2016). Эффективность РНКи ограничена концентрациями молекул малых РНК. Таким образом, эффект РНКи нестабилен и прекращается после прекращения синтеза дцРНК. Побочные эффекты РНКи могут возникать в случае, когда вводимая молекула РНК имеет последовательность, комплементарную нескольким генам одновременно, что приводит к снижению экспрессии сразу нескольких генов. В настоящее время разработан целый ряд компьютерных программ, позволяющих подбирать интерферирующие РНК с высокой степенью надежности. Хорошие результаты дает использование методики “тег-опосредованной потери функции гена”, когда исследуемый ген сливают в одной рамке трансляции с геном GFP, и для РНКи используют малые интерферирующие РНК против GFP (Neumüller et al., 2012).

САЙТ-НАПРАВЛЕННЫЙ МУТАГЕНЕЗ И РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНА

Важным этапом обратной генетики стала разработка метода направленной инактивации генов с использованием бактериальной системы CRISPR/Cas9. РНК, транскрибирующиеся с локуса CRISPR (сгРНК), вступают в комплекс с транс-кодируемыми CRISPR-РНК (tracrРНК) и с ферментом каспазой Cas9. Комплекс связывается с комплементарной ДНК, которую каспаза разрушает. Для проведения экспериментов с использованием системы CRISPR/Cas9 малые РНК объ-

единяют в одну, которую называют гидовой РНК (gРНК).

Недавно получены трансгенные линии дрозофилы, экспрессирующие Cas9 под контролем промоторов генов *nanos (nos)* или *vasa* (рис. 5). Эти линии использовали в качестве реципиентов для инъекции плазмид, экспрессирующих gРНК под промотором малой ядерной РНК U6, что позволило значительно повысить эффективность метода (Kondo, Ueda, 2013; Port et al., 2014).

Самый простой способ модификации гена на основе технологии CRISPR/Cas9 – это введение коротких вставок/делеций (индел) путем стимулирования негомологичного соединения концов ДНК, которое часто приводит к мутациям сдвига рамки считывания и, следовательно, к выключению гена или синтезу усеченного белка. Поскольку размер индел является случайным, значительное количество клеток будет содержать мутации, которые не нарушают функцию гена. В результате, полученные особи – это, как правило, генетические мозаики, состоящие из клеток с двумя, с одной или без функциональной копии нокаут-руемого гена (Port et al., 2014).

Недавно показано, что несколько событий CRISPR могут происходить в одной клетке одновременно. Метод ко-CRISPR или метод совместной конверсии, первоначально разработанный для *C. elegans*, успешно применен и у дрозофилы (Kane et al., 2017). Метод основан на одновременной инъекции эмбрионов pos-Cas9 смесью gРНК к интересующему гену и селективному маркеру – гену *ebony*. Ожидается, что в любой клетке, в которой будет выключен *ebony*, следует ожидать мутации в исследуемом гене. Таким образом, потомство, демонстрирующее потерю *ebony*, отбирают для молекулярного анализа целевого гена (Kane et al., 2017).

Использование каспазы Cas9, сшитой с флуоресцентным белком, лежит в основе нового метода CASFISH (флуоресцентной гибридизации *in situ*, опосредуемой CRISPR-Cas9), который позволяет флуоресцентно метить локусы-мишени (Port et al., 2014). Каспазу можно использовать для подавления транскрипции гена-мишени (в случае, когда она связывается с ним в области промотора, регуляторных областей или начала кодирующей области); кроме того, для подавления транскрипции к каспазе может быть пришит репрессор или активатор транскрипции. Введенные белковые метки могут быть не только регуляторами, но и репортерами, например, флуоресцентными белками (YFP, GFP, mCherry и т.д.) или эпитопами (FLAG, STREPII, Мус и т.д.) (Thorn, 2017). Меченые белки можно визуализировать *in vivo* с помощью флуоресцентной микроскопии или иммуногистохимии, а эпитомы также можно использовать в биохимических исследованиях, например, в комплексной очистке целевого белка.

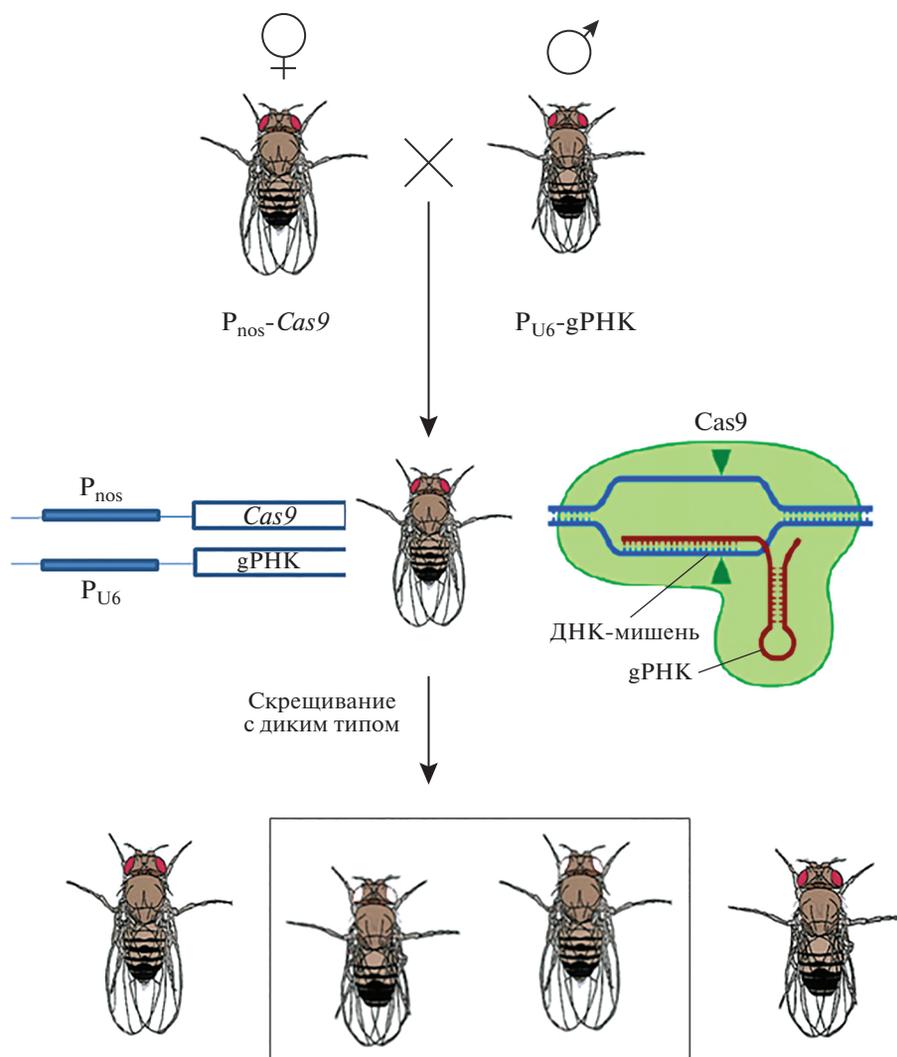


Рис. 5. Метод нокаута гена, с использованием системы CRISPR/Cas9. Активация системы происходит у гибридов при скрещивании самок, экспрессирующих Cas9 под промотором гена *nos*, с самцами, экспрессирующими гидовую РНК под промотором U6. Полученные гибриды после скрещивания с диким типом могут давать потомков с выключенным исследуемым геном, например, геном *white* (мутантные потомки выделены рамкой).

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ В ОТДЕЛЬНЫХ КЛЕТКАХ

Секвенирование транскриптомов отдельных клеток (single cell RNA-sequencing, scRNA-seq) — чрезвычайно важный подход в онтогенетических исследованиях. С помощью него уже удалось провести общий анализ раннего развития млекопитающих. Для нематоды *C. elegans* был составлен молекулярный атлас эмбрионального развития с клеточным разрешением. Дрозофила не стала исключением. Одна из первых работ, сделанных с применением секвенирования РНК единичных клеток, была посвящена исследованию механизма дозовой компенсации в ходе раннего эмбрионального развития (Lott et al., 2011).

Не менее перспективными представляются исследования развития центральной нервной си-

стемы, включая головной мозг. Мозг дрозофилы содержит около 100000 нейронов, количество их предшественников — примерно 200 нейробластов. Управление развитием может быть представлено в виде сети. Чтобы исследовать транскрипционные сети, лежащие в основе развития различных линий нейробластов, в работе (Yang et al., 2016) поместили и выделили нейробласты, специфичные для отдельных клеточных линий, и секвенировали их транскриптомы. Конкретные нейробласты были маркированы с использованием системы GAL4/UAS и отслеживались на протяжении всего нейрогенеза.

Крыловой имагинальный диск дрозофилы является важной модельной системой для изучения роста ткани, морфогенеза эпителия, межклеточной передачи сигналов, клеточной конкуренции и др. Паттерны экспрессии подавляющего боль-

Таблица 1. Процессы развития, моделируемые на дрозофиле с использованием новых генетических технологий

Биологический процесс	Ссылки на публикации
Оогенез	Gaziova et al., 2004; Hudson, Cooley, 2014; Rubin, Huynh, 2015; Rodal et al., 2015; Hsu et al., 2019
Раннее эмбриональное развитие	Lott et al., 2011; Neumüller et al., 2012; Fernandez, Lagha, 2019; Mazina et al., 2019; Weisman, 2019; Zhou et al., 2019
Развитие мозга и нервной системы	Jennett et al., 2012; Xue et al., 2014; Frickenhaus et al., 2015; Jin et al., 2016; Yang et al., 2016; Spirov, Myasnikova, 2019; Liu et al., 2020
Развитие крыла	Schertel et al., 2015; Xu et al., 2017; Bageritz et al., 2019
Развитие мышц и регенерация	Frickenhaus et al., 2015; Gunage et al., 2017; Kopke et al., 2020
Гемопоез и развитие сердца	Frasch, 2016; Banerjee et al., 2019
Развитие трахеи	Chandran et al., 2014; Amourda, Saunders, 2017

шинства генов в крыловом диске неизвестны. Чтобы получить полный атлас экспрессии генов в крыловом диске, в работе (Bageritz et al., 2019) использовали секвенирование отдельных клеток и разработали новый метод анализа данных scRNA-seq, основанный на корреляциях экспрессии генов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Вековая история дрозофилы в биологии сопровождается постоянным расширением новых методов манипуляции с геномом, получением коллекций доступных для исследователей трансгенных линий, которые насчитывают более 100000. Создаются и постоянно обновляются базы данных геномных и генетических ресурсов дрозофилы, расширяются биоинформатические подходы к анализу генома. С расширением методической базы расширяются и возможности использования дрозофилы как модели для изучения отдельных процессов развития. В табл. 1 перечислены некоторые примеры использования дрозофилы как модели с применением вышеописанных технологий в последние годы. Все это позволяет заключить,

что дрозофила, в ближайшее время будет по-прежнему востребована как объект исследований в генетике развития.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор благодарит д. б. н. О.Б. Симонову за плодотворное обсуждение статьи.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнялась в рамках программы НИР биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова “Молекулярно-генетические механизмы нестабильности генома и мутагенеза у животных и человека” (АААА-А16-116021660038-4).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания выполненных автором исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Автор заявляет, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ameres S.L., Zamore P.D.* Diversifying microRNA sequence and function // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2013. V. 14. № 8. P. 475–488.
- Amourda C., Saunders T.E.* Gene expression boundary scaling and organ size regulation in the *Drosophila* embryo // *Dev. Growth Differ.* 2017. V. 59. № 1. P. 21–32.
- Bageritz J., Willnow P., Valentini E. et al.* Gene expression atlas of a developing tissue by single cell expression correlation analysis // *Nat. Methods.* 2019. V. 16. № 8. P. 750–756.
- Banerjee U., Girard J.R., Goins L.M. et al.* *Drosophila* as a genetic model for hematopoiesis // *Genetics.* 2019. V. 211. № 2. P. 367–417.
- Bateman J.R., Lee A.M., Wu C.T.* Site-specific transformation of *Drosophila* via phiC31 integrase-mediated cassette exchange // *Genetics.* 2006. V. 173. P. 769–777.
- Bellen H.J., Levis R.W., Liao G. et al.* The BDGP gene disruption project: single transposon insertions associated with 40% of *Drosophila* genes // *Genetics.* 2004. V. 167. № 2. P. 761–781.
- Bischof J., Maeda R.K., Hediger M. et al.* An optimized transgenesis system for *Drosophila* using germ-line-specific PhiC31 integrases // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007. V. 104. P. 3312–3317.
- Bosch J.A., Sumabat T.M., Hariharan I.K.* Persistence of RNAi-mediated knockdown in *Drosophila* complicates mosaic analysis yet enables highly sensitive lineage tracing // *Genetics.* 2016. V. 203. № 1. P. 109–118.
- Brand A.H., Perrimon N.* Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes // *Development.* 1993. V. 118. № 2. P. 401–415.
- Branda C.S., Dymecki S.M.* Talking about a revolution: The impact of site-specific recombinases on genetic analyses in mice // *Dev. Cell.* 2004. V. 6. № 1. P. 7–28.
- Chandran R.R., Iordanou E., Ajja C. et al.* Gene expression profiling of *Drosophila* tracheal fusion cells // *Gene Expr. Patterns.* 2014. V. 15. № 2. P. 112–123.
- Dietzl G., Chen D., Schnorrrer F. et al.* A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila* // *Nature.* 2007. V. 448. № 7150. P. 151–156.
- Duc C., Yoth M., Jensen S. et al.* Trapping a somatic endogenous retrovirus into a germline piRNA cluster immunizes the germline against further invasion // *Genome Biol.* 2019. V. 20. № 1. P. 127.
- Ewen-Campen B., Yang-Zhou D., Fernandes V.R. et al.* Optimized strategy for in vivo cas9-activation in *Drosophila* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2017. V. 114. P. 9409–9414.
- Fernandez C., Lagha M.* Lighting up gene activation in living *Drosophila* embryos // *Methods Mol. Biol.* 2019. V. 2038. P. 63–74.
- Frasch M.* Genome-wide approaches to *Drosophila* heart development // *J. Cardiovasc. Dev. Dis.* 2016. V. 3. № 2. pii:20.
- Frickenhaus M., Wagner M., Mallik M. et al.* Highly efficient cell-type-specific gene inactivation reveals a key function for the *Drosophila* FUS homolog *cabeza* in neurons // *Scientific Reports.* 2015. V. 5. P. 9107.
- Gaziova I., Bonnette P.C., Henrich V.C., Jindra M.* Cell-autonomous roles of the ecdysoneless gene in *Drosophila* development and oogenesis // *Development.* 2004. V. 131. № 11. P. 2715–2725.
- Golic K.G., Golic M.M.* Engineering the *Drosophila* genome: Chromosome rearrangements by design // *Genetics.* 1996. V. 144. P. 1693–1711.
- Groth A.C., Fish M., Nusse R. et al.* Construction of transgenic *Drosophila* by using the site-specific integrase from phage PhiC31 // *Genetics.* 2004. V. 166. P. 1775–1782.
- Gunage R.D., Dhanyasi N., Reichert H. et al.* *Drosophila* adult muscle development and regeneration // *Semin Cell Dev. Biol.* 2017. V. 72. P. 56–66.
- Hsu H.J., Bahader M., Lai C.M.* Molecular control of the female germline stem cell niche size in *Drosophila* // *Cell Mol. Life Sci.* 2019. V. 76. № 21. P. 4309–4317.
- Hudson A.M., Cooley L.* Methods for studying oogenesis // *Methods.* 2014. V. 68. № 1. P. 207–217.
- Jennett A., Rubin G., Ngo T. et al.* A GAL4-driver line resource for *Drosophila* neurobiology // *Cell Rep.* 2012. V. 2. № 4. P. 991–1001.
- Jin M., Eblimit A., Pulikkathara M. et al.* Conditional knockout of retinal determination genes in differentiating cells in *Drosophila* // *FEBS J.* 2016. V. 283. № 15. P. 2754–2766.
- Kane N.S., Vora M., Varre K.J. et al.* Efficient screening of CRISPR/Cas9-induced events in *Drosophila* using a co-CRISPR strategy // *G3 Genes Genomes Genet.* 2017. V. 7. P. 87–93.
- Kennerdell J.R., Carthew R.W.* Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that *frizzled* and *frizzled 2* act in the wingless pathway // *Cell.* 1998. V. 95. № 7. P. 1017–1026.
- Kidwell M.G.* Hybrid dysgenesis in *Drosophila melanogaster*: nature and inheritance of P element regulation // *Genetics.* 1985. V. 111. P. 337–350.
- Knapp J.M., Chung P., Simpson J.H.* Generating customized transgene landing sites and multi-transgene arrays in *Drosophila* using PhiC31 integrase // *Genetics.* 2015. V. 199. P. 919–934.
- Kondo S., Ueda R.* Highly improved gene targeting by germline-specific Cas9 expression in *Drosophila* // *Genetics.* 2013. V. 195. P. 715–721.
- Kopke D.L., Leahy S.N., Vita D.J. et al.* Carrier of wingless (cow) regulation of *Drosophila* neuromuscular junction development // *eNeuro.* 2020. pii: ENEURO.0285-19.2020.
- Lee T., Luo L.* Mosaic analysis with a repressible cell marker (MARCM) for *Drosophila* neural development // *Trends Neurosci.* 2001. V. 24. № 5. P. 251–254.
- Liu Z., Chen Y., Rao Y.* An RNAi screen for secreted factors and cell-surface players in coordinating neuron and glia development in *Drosophila* // *Mol. Brain.* 2020. V. 13. № 1. P. 1.
- Lobo N., Li X., Fraser M.J.* Transposition of the piggybac element in embryos of *Drosophila melanogaster*, *Aedes aegypti* and *Trichoplusia ni* // *Mol. Gen. Genet.* 1999. V. 261. P. 803–810.
- Lott S.E., Villalta J.E., Schroth G.P. et al.* Noncanonical compensation of zygotic X transcription in early *Drosophila melanogaster* development revealed through single-embryo RNA-seq // *PLoS Biol.* 2011. V. 9. № 2. e1000590.
- Loukeris T.G., Arcà B., Livadaras I. et al.* Introduction of the transposable element *minos* into the germ line of *Dro-*

- sophila melanogaster* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995. V. 92. P. 9485–9489.
- Mazina M.Y., Krasnov A.N., Georgiev P.G. et al. The development of reporter system for the investigation of molecular mechanisms of ecdysone response // Dokl. Biochem. Biophys. 2019. V. 485. № 1. P. 138–140.
- McGuire S.E., Roman G., Davis R.L. Gene expression systems in *Drosophila*: a synthesis of time and space // Trends Genet. 2004. V. 20. № 8. P. 384–391.
- Weisman N.Ya. Genetic and Epigenetic Pathways of lethal (2) giant larvae Tumor Suppressor in *Drosophila melanogaster* // Russian J. Genetics. 2019. V. 55. № 2. P. 133–143.
- Nagarkar-Jaiswal S., DeLuca S.Z., Lee P.-T. et al. A genetic toolkit for tagging intronic MiMIC containing genes // Elife. 2015. V. 4. e08469.
- Nakazawa N., Taniguchi K., Okumura T. et al. A novel cre/loxP system for mosaic gene expression in the *Drosophila* embryo // Dev. Dyn. 2012. V. 241. P. 965–974.
- Neumüller R.A., Wirtz-Peitz F., Lee S. et al. Stringent analysis of gene function and protein-protein interactions using fluorescently tagged genes // Genetics. 2012. V. 190. № 3. P. 931–940.
- Perkins L.A., Holderbaum L., Tao R. et al. The Transgenic RNAi Project at Harvard Medical School: Resources and Validation // Genetics. 2015. V. 201. № 3. P. 843–852.
- Port F., Chen H.M., Lee T. et al. Optimized CRISPR/Cas tools for efficient germline and somatic genome engineering in *Drosophila* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2014. V. 111. E2967–E2976.
- Ramadan N., Flockhart I., Booker M. et al. Design and implementation of high-throughput RNAi screens in cultured *Drosophila* cells // Nat. Protoc. 2007. V. 2. № 9. P. 2245–2264.
- Riggleman B., Wieschaus E., Schedl P. Molecular analysis of the armadillo locus: Uniformly distributed transcripts and a protein with novel internal repeats are associated with a *drosophila* segment polarity gene // Genes Dev. 1989. V. 3. P. 96–113.
- Rodal A.A., Del Signore S.J., Martin A.C. *Drosophila* comes of age as a model system for understanding the function of cytoskeletal proteins in cells, tissues, and organisms // Cytoskeleton (Hoboken). 2015. V. 72. № 5. P. 207–224.
- Rong Y.S. Gene targeting by homologous recombination: a powerful addition to the genetic arsenal for *Drosophila* geneticists // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2002. V. 297. № 1. P. 1–5.
- Rubin G.M., Spradling A.C. Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors // Science. 1982. V. 218. P. 348–353.
- Rubin T., Huynh J.R. Mosaic Analysis in the *Drosophila melanogaster* ovary // Methods Mol. Biol. 2015. V. 1328. P. 29–55.
- Ryder E., Ashburner M., Bautista-Llacer R. et al. The DrosDel deletion collection: a *Drosophila* genome-wide chromosomal deficiency resource // Genetics. 2007. V. 177. P. 615–629.
- Ryder E., Russell S. Transposable elements as tools for genomics and genetics in *Drosophila* // Brief Funct. Genomic Proteomic. 2003. V. 2. № 1. P. 57–71.
- Schertel C., Albacara M., Rockel-Bauer C. et al. A large-scale, in vivo transcription factor screen defines bivalent chromatin as a key property of regulatory factors mediating *Drosophila* wing development // Genome Res. 2015. V. 25. № 4. P. 514–523.
- Spirov A.V., Myasnikova E.M. Evolutionary stability of gene regulatory networks that define the temporal identity of neuroblasts // Mol. Biol. (Mosk.). 2019. V. 53. № 2. P. 225–239.
- Theodosiou N.A., Xu T. Use of FLP/FRT system to study *Drosophila* development // Methods. 1998. V. 14. № 4. P. 355–365.
- Thorn K. Genetically encoded fluorescent tags // Mol. Biol. Cell. 2017. V. 28. P. 848–857.
- Venken K.J., Schulze K.L., Haelterman N.A. et al. MiMIC: A highly versatile transposon insertion resource for engineering *Drosophila melanogaster* genes // Nat. Methods. 2011. V. 8. P. 737–743.
- Xu X.S., Gantz V.M., Siomava N. et al. CRISPR/Cas9 and active genetics-based trans-species replacement of the endogenous *Drosophila* kni-L2 CRM reveals unexpected complexity // Elife. 2017. V. 6. pii:e30281.
- Xue Z., Ren M., Wu M. et al. Efficient gene knock-out and knock-in with transgenic Cas9 in *Drosophila* // G3 (Bethesda). 2014. V. 4. № 5. P. 925–929.
- Yang C.P., Fu C.C., Sugino K. et al. Transcriptomes of lineage-specific *Drosophila* neuroblasts profiled by genetic targeting and robotic sorting // Development. 2016. V. 143. № 3. P. 411–421.
- Zhou J., Schor I.E., Yao V. et al. Accurate genome-wide predictions of spatio-temporal gene expression during embryonic development // PLoS Genet. 2019. V. 15. № 9. e1008382.

***Drosophila melanogaster* as a Model of Development Genetics: Modern Approaches and Prospects**

L. N. Nefedova*

Faculty of Biology, Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

*e-mail: lidia_nefedova@mail.ru

For more than a hundred years, the fruit fly *Drosophila melanogaster* has successfully served as a universal model in various genetic studies, including studies of the genetic control of individual development. To date, a whole arsenal of reverse genetics methods has been developed for *Drosophila*, making it quite easy to manipulate its genome, which allows *Drosophila* to be considered one of the most powerful models of developmental genetics. The review considers the main modern methods for studying the expression and function of genes in *Drosophila* and the prospects for their use.

Keywords: *Drosophila*, developmental genetics, model, gene expression