

## Artırıcı Tuzakları

### *Enhancer Traps*

Mehmet Ali SÖZEN

*Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji AD, Afyonkarahisar*

#### ÖZET

Son otuz yıldaki moleküler biyoloji alanında meydana gelen ilerlemeler pekçok yeni tekniğin ortaya çıkmasına yol açmıştır. Bunlardan biri olan sirke sineği yani *Drosophila*'da geliştirilen artırıcı (enhanser) tuzağı tekniği değişik dokularda gen ekspresyon kalıplarını inceleyerek ilgili dokularda spesifik olarak ifade edilen yeni genleri önce gen ekspresyonu bazında, daha sonra da klonlama ve karakterize ederek belirlemeye olanak sağlamaktadır. Ayrıca, "revers (ters) genetik" yaklaşımıyla ilgilenilen bir dokudaki gen ekspresyon kalıplarının taranması yeni aday genleri klonlamaya ve hedefli gen ekspresyonuna olanak sağladığı kadar dokunun formal alt-bölmelerinin çıkarılması için de kullanılabilir. Bu teknik gerek kanserle ilgili gerekse spesifik dokulardaki biyokimyasal mekanizmalara hücrel ve moleküler düzeyde ışık tutmak için yeni aday genlerin deteksiyonunu sağlayabilmekte ve onların rollerinin sorgulanmasına imkan vermektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Artırıcı tuzağı, gen ekspresyonu, *Drosophila melanogaster*, P-elementi, transpozon, raportör gen.

#### ABSTRACT

Advances in the molecular biology in the last three decades has led to emerge of many novel techniques. One of them is enhancer trapping developed in the *Drosophila* which enable us to identify new genes specifically expressed in a specific tissue; first on the basis of gene expression and secondly on the molecular level by cloning and characterization. In addition, screening of the gene expression domains in a tissue of interest can be used to deduce a formal subdivision of a tissue as well as for targeted gene expression through the approach of "reverse genetics". And this technique can also identify new candidate genes and their roles can be questioned to enlighten many biochemical mechanisms such as cell signalling relevant to cancer or in the specific tissues on cellular and molecular level.

**Key Words:** Enhancer trap, gene expression, *Drosophila melanogaster*, P-element, transposon, reporter gene.

#### GİRİŞ

Sirke veya meyve sineği olarak da bilinen *D. melanogaster* genetik diseksiyona elverişli eşsiz bir hayvan modelidir (1). Bu organizmanın genomunun manipülasyonu için geliştirilen araçlar arasında hem *E. Coli* için ve hem de *Drosophila* için seçilebilen markerler taşıyan sentetik P-elementlerinin dizaynı alternatif genetik konstrakları genom içerisine entegrasyon için bir dizi aracı vektörler sağlamıştır (2). Fonksiyonel transpozaz kaynağı olarak mobilizasyon-arızalı P-elementleri taşıyan mutant *D. melanogaster* soylarıyla ilgili olarak, sadece transpozaz kaynağı ile

çaprazlamalarla, sentetik P-elementleri genom içinde hareket ettirilebilir ve istendiğinde stabil yerlerde tuzaga düşürülüp kalması sağlanabilir. Sentetik P-elementi çok zayıf bir promotörün aşığında (kontrolünde) bir raportör gen içerdiğinde (*E.coli LacZ* genini kodlayan  $\beta$ -galaktozidaz gibi) tuzaga düşürülen P-elementleri –eğer varsa- entegrasyon yerlerindeki genomik kontrol elementlerinin etkilerini rapor edebilirler (3,4).

Bu makalede artırıcı tuzağı tekniği, bu tekniğin başlıca avantajları, dezavantajları ve kullanım alanları hakkında literatür bilgisi ve kendi deneyimlerimizi sunma amaçlanmıştır.

## TRANSPOZE OLABİLEN ELEMENTLER VE ARTIRICI TUZAKLARI

Kompleks organizmalarda, moleküler klonlama için doğada kromozomdaki yerini aynı kromozomda başka bir yere veya diğer bir kromozomda başka bir pozisyona değiştirebilen transpozonlar formunda uygun vektörler bulunmaktadır. Transpozonlar, şu ana kadar pek çok organizmada gösterilmiştir (5). Birçok transpozon birçok faydalı özellikleri olan ve markerlere sahip güçlü vektörler elde edebilmek için modifiye edilmiştir.

Sirke sineğinde (*Drosophila melanogaster*) transpoze olabilen elementlerden P ailesi, ökaryotik retroviral olmayan transpozon ailesinden en iyi çalışılmış olanıdır. Bu nedenle de genetik çalışmalarda etkin bir model olduğu kanıtlanmıştır (6). Bu hareketli elementler *Drosophila* moleküler genetiğinde devrim yapmışlar; gen transferi, insersiyonel mutajenez, artırıcı tuzakları ve gen ekspresyonunu çalışmak için eşsiz bir sistem olan transpozon hedeflemesi ile gen klonlaması gibi teknikleri sağlamıştır (7). Doğal tam P-elementi 2,9 kb uzunlukta ve transpozisyon için gerekli olduğu düşünülen her iki uçta 31 bç'lik ters tekrarlar, açık okuma çerçevelerine sahiptir ki transpozaz olarak bilinen 87 kD'luk bir proteini kodlar. Bunlar belli genetik koşullarda çok yüksek oranlarda transpozisyon yapabilme yeteneğine sahiptirler (8,9, 10).

Normal durumlarda P-elementi transpozisyonunun çok yüksek frekansta ancak P dizisi (P-elementi içeren) bir erkek ve M dizisi (P-elementi içermeyen) bir dişi arasındaki çaprazlamadan meydana gelen nesillerde mayoz esnasında oluştuğu gözükmemektedir.

P-elementinin mobilizasyonu disgenik özellikler olan azalan fertilitate, mutasyon indüksiyonu, kromozom yeni düzenlenmelerine sadece germ hücrelerinde yol açarken; resiprokal çaprazlamalarda (PxP ve MxM) aynı durum gözlenmemektedir.

Bunun sadece germ hücrelerinde olmasına farklı kırılma olayının yol açtığı ki bu yolla mRNA ancak germ hücrelerinde doğru olarak ekzonların kesilip uç uca eklenmesi olayına (splicing) tabi tutulduğu düşünülmektedir (11).

Transpozaz enzimi P-elementinin hareketi için kritik bir olgudur. Bu enzimi kodlayan gen başka alternatif genlerle değiştirilebilir ve aynı zamanda transpozaz enzimi de başka yollardan sağlanabilir. Yani, transpozaz geninin gerçek P-elementte olması gerekmediği ve trans olarak da diğer kromozomlarda çalıştığı artık bilinmektedir. Bu gerçek transpozaz enzimlerine sahip olmayan rekombinant P-elementlerinin konstrüksiyonuna olanak vermiştir. Yaygın bir transpozaz kaynağı, defektif P-elementi  $\Delta 2-3$ 'dir. Bu P-elementinde  $\Delta 2-3$  internal (dahili) bir delesyonla transpozisyon için zorunlu olan 31 bç'lik ters tekrarlardan birisi uzaklaştırılmış transpozaz geni sağlam kalmakla beraber somatik ekspresyona imkan vermektedir (12).

Bu teknik modifiye P-elementi teknolojisi için daha da geliştirilerek artırıcı (enhanser veya çoğaltıcı) tuzakları (enhancer traps) elementlerinin gelişimine tanıklık etmemizi sağlamıştır. Bir artırıcı detektörü raportör gen içeren mobilize edilebilen DNA konstraktı olup, kendi başına çok zayıf ifade edilen; ancak yakın genomik transkripsiyonel regülatör elementlerinin etkisi altındaki bir genomik bölgeye entegre olduğunda, yakınındaki genlerin ekspresyon kalıbını yansıtan bir raportör gen aracılığıyla gen ekspresyonu incelenebilir (3).

## ARTIRICI TUZAĞI TEKNİĞİNİN TARİHİ GELİŞİMİ

Artırıcı tuzağı, spesifik hücre tiplerinin gelişiminin analizini ve *Drosophila* hücre tipleri ve dokularda spesifik olarak ifade edilen genlerin tanımlanmasını sağlayan güçlü bir tekniktir. Bundan öte, bu teknik birçok farklı araştırma alanlarında uygulanabilir.

Klonlanan P-elementi transpozisyonu ilk defa kromozom dışı DNA'dan *Drosophila* embriyoları germ hücreleri DNA'sına etkin ve selektif olarak Rubin ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir (2, 13). Bu ilk transgenik sineğin ortaya çıkışını gösteren gelişme *Drosophila*'da belli genetik kriterler dahilinde DNA-aracılığıyla etkin gen transferinin temelini oluşturmuştur. Bunu P-elementi transpozonlarının modifiye formlarını yani raportör gen olarak lacZ genini kullanarak *Drosophila* genomunda rastgele entegre olabilen mobil (hareketli) DNA elementlerini oluşturan "1. nesil artırıcı tuzakları elementleri" izledi (3). Böyle diziler birkaç yıl boyunca önemli bir miktar oluşturan çeşitli gen ekspresyon kalıpları sağladı (3, 4, 14, 15). 1. nesil artırıcı tuzaklarının ortaya çıkışının bir yıl sonrasında bir maya transkripsiyon faktörünün, GAL4, *Drosophila*'da gen ekspresyonunu aktifleştirdiği gösterildi (16). İzleyen yıllarda ikili (binary) sistem potansiyeli anlaşıldı ve böylece GAL4'un doku-spesifik bir promotordan ekspresyonu (17) ve klonlanmış promotor elementlerine ihtiyaç duymaksızın hücre-tipi spesifik GAL4 ekspresyon kalıpları sağlandı (18, 19, 20, 21,22).

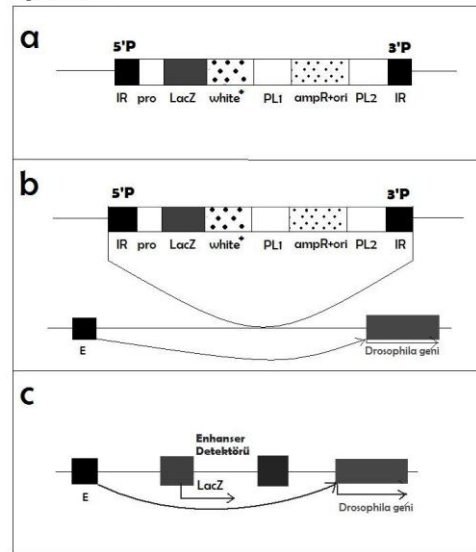
### 1. NESİL ARTIRICI TUZAKLARI

Raportör gen olarak *Escherichia coli*'nin  $\beta$ -galaktozidaz'ı kodlayan (*lacZ*) geninin kullanıldığı 1. Nesil Artırıcı Tuzakları'nda ilgili konstrakt ayrıca görülebilen belirteç (marker) gen olarak (Şekil 1.a) normal kırmızı göz rengi için gerekli olan bir ürünü kodlayan *white*(w<sup>+</sup>) genini de içerir (3, 23). Transpozon bu gene sahip olmayan bir sineğe verildiğinde göz rengi markeri transforme olan sineklerin stabil olarak seçimini sağlar. Bu genlere ilaveten *E. Coli* için bir replikasyon orijini (*ori*) ve transforme olan *E. coli* hücrelerine ampisilin direnci veren  $\beta$ -laktamaz genlerini (*ampR*) içeren multipl klonlama sitesinden lineer hale getirilmiş ticari vektör plazmid, pBluescript'in tam kopyesi bulunur. Bu diziler 2 polilinker (PL1 ve PL2) ile çevrili olup transpozisyon için gerekli olan P-transpozon ters tekrar dizileri de mevcuttur. Bu füzyon geni P-element konstraktının bir bölümünü oluşturmakta ve *Drosophila* genomunda

farklı yerlere entegre olabilmektedir (Şekil 1. b).

P-transpozaz promotörü yakındaki genomik kontrol elementleri tarafından etkilenebilir ve füzyon geni üzerinde temporal (zamansal) ve spasyel (mekansal) regülasyona yol açabilir. Bu durum ancak *Drosophila* promotor/enhanser elementinin yakınındaki (etki alanına) bir yere transpozisyonu halinde, *lacZ* geni aktifleşir ve  $\beta$ -galaktozidaz üretilir. Eğer transkripsiyon doku-spesifik bir artırıcı element tarafından olursa, doku-spesifik *lacZ* ekspresyonları ortaya çıkar (Şekil 1. c) ki ya immünohistokimyasal tekniklerle veya kabaca  $\beta$ -galaktozidaz aktivitesinin testi için substratı olan X-gal (5-bromo-4-kloro-3-indolil- $\beta$ -D-galaktozid) kullanılarak deteksiyonu yapılabilir (3).

Şekil-1



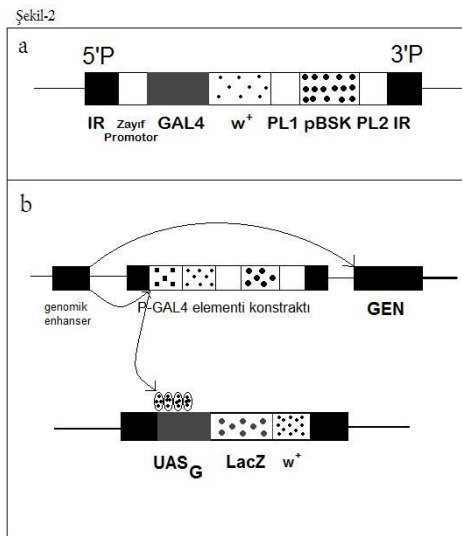
Şekil 1. Birinci nesil artırıcı tuzaklarının şematik gösterimi.

a) *Drosophila*'daki birinci nesil artırıcı detektörü transpozonların genel özellikleri b) Birinci nesil artırıcı detektöründe gen regülasyon elementlerinin  $\beta$ -galaktozidaz ekspresyonu üzerindeki etkileri. Bu hipotetik (farazi) durumda ilgili artırıcı normalde yakındaki *Drosophila* geni üzerinde etkisini gösterir. c) Bu durumdaki gibi artırıcı detektörü bir genin transkripsiyon başlama noktası yakınında bir yere insersiyon yaparsa, onun da transkripsiyonu yapılır ve onun ekspresyonu renk verici bir substrat olan X-gal uygulanarak gözlenebilir. Kısaltmalar: IR, inverted repeat = Ters tekrarlar: PL, polilinker. (Bellen ve ark, 1990'dan hafif değişiklikle adapte edilmistir).

## 2. NESİL ARTIRICI TUZAKLARI

Raportör gen özellikle nöronları çalışmada büyük bir sorun olan hücre geometrisinin tüm detaylarını perdeleyen sadece çekirdekte lokalizasyon sinyali taşıdığından dolayı 1. nesil artırıcı tuzaklarının faydaları sınırlı idi. Öte yandan 2. nesil artırıcı tuzakları hem nükleer ve hem de sitoplazmik hedefli raportör genler kullanabilme olanağı sağlaması nedeniyle bu sorunun üstesinden gelmiştir (24).

2. nesil artırıcı tuzakları kendileri hiçbir histokimyasal raportör gene sahip değildirler. P-elementi konstraktındaki genler bir maya regülatör proteini olan GAL4'u kapsar ki bu protein spesifik bir diziyeye, "UAS<sub>G</sub>" (galactose upstream activating sequence), bağlanır ve ona bağlı olan genlerin transkripsiyonunu etkinleştirir. Bu da Şekil 2.a'da görüldüğü gibi, 1. nesil artırıcı tuzaklarındaki (3) P-lacZ elementindeki lacZ genine benzer bir tarzda oluşturulmuştur (18). Yani, konstrakt zayıf bir promotor, *white* (*w*<sup>+</sup>) geninin fonksiyonel bir kopyesi, ters tekrarlar içinde *E. Coli* için bir replikasyon orijini (*ori*) ve transforme olan *E. Coli* hücrelerine ampisilin direnci veren β-laktamaz (*ampR*) genlerini içeren plazmid vektör pBluescript'e sahiptir (Şekil 2. b).



Şekil 2. Nesil artırıcı tuzaklarının şeması.

a) İkinci nesil artırıcı tuzağı elementi ve b) Çalışma mekanizması (Kaiser, 1993'ten modifiye edilmiştir).

Bu sayede P-elementi restriksiyon enzimleri kullanılarak yakınındaki bir parça genomik DNA ile birlikte genomden kesilip dışarı alınabilmektedir.

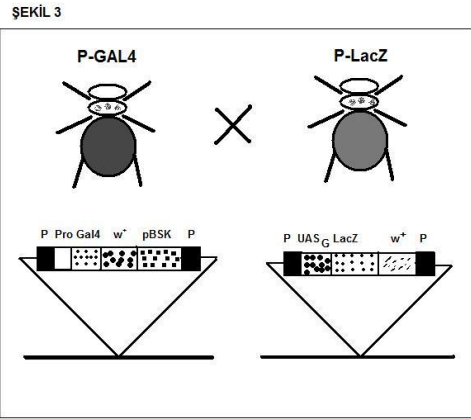
Bu parça daha sonra sirküler (halkasal) hale getirilebilir ve "plazmid kurtarma" diye bilinen bir teknikle *E. Coli*'de transforme edilebilir. Toplam olarak bu element yaklaşık 10 kb uzunlukta ve hala genomik transpozaz kaynağı olan Δ2-3 vasıtasıyla transpozisyon yapabilmektedir (12).

GAL4'un bağlandığı "UAS<sub>G</sub>" dizisi *Drosophila*'da yoktur ve bu yüzden bilindiği kadarıyla GAL4'un normal gen transkripsiyonu üzerine hiçbir etkisi yoktur. Kendi regülatör dizilerinden yoksun *hsp70* (heat shock protein 70) promotorunun yukarısında (upstream) UAS<sub>G</sub> dizisine sahip konstraktlar, alternatif genleri aktive etmek için kullanılabilir. Bunlardan ilk kullanılanı *lacZ* geni idi (Şekil 3). Bununla beraber, kritik olarak P(GAL4) elementi marker olarak *lacZ* geninin ekspresyonu ile sınırlı değildir; istenilen herhangi bir genin konstraktı yapılabılır ki bu hücre-spesifik tarzda sağlam organizmada eşsiz müdahale olanağı sağlar (25, 26, 27).

## ARTIRICI TUZAĞI TEKNİĞİNİN AVANTAJLARI VE KULLANIM ALANLARI

Artırıcı tuzağı teknolojisi gen ekspresyonunun mekansal kalıplarına dair değerli bilgiler sağlamıştır (28, 29, 30). Bu teknik sayesinde bazı önemli genler karakterize edilmiştir (31, 32, 33). Yakın zamanlarda, bu teknik *Drosophila*'nın yanı sıra fare (34), zebra balığı (35, 36) ve *Arabidopsis* (37, 38, 39, 40, 41) gibi diğer model organizmalarda da uygulanmıştır.

Artırıcı tuzağı insersiyonları bazı özel hücre ve dokulardaki genleri ekspresyon kalıbı bazında belirlemek için önemli bir metod sağlar. Çünkü insersiyonlar normal genlerin fonksiyonlarını her zaman bozmak durumunda değildir.



**Şekil 3.** GAL4 üzerinden  $UAS_G-LacZ$  ekspresyonunun deteksiyonu.

Ekspresyon kalıbını ortaya çıkarmak için P(GAL4) elementinin yeni insersiyonlarını taşıyan sinekler 2. kromozomu üzerinde GAL4-bağımlı  $UAS_G$  üzerinden ekspresyonu yapılan lacZ geni taşıyan sineklerle çaprazlanır. Bu çaprazlanmanın döllerini incelemek için örneğin ön tarama gibi, ya tüm embryo veya larva ve erişkin dokuları disseksiyon sonrası önce fikse edilir ve sonra da renk verici maddeyi (X-gal) içeren renkli çözelti ile boyanır.

Böylece, bu teknik gelişim aşamaları boyunca ve erişkin dokularda hücre tiplerini veya alt-bölgeleri belirlemek için markerler sağlar ki bunları başka şekilde tanımak çok zordur veya sürekli elde etme imkanı olmayabilir. Bundan başka, bu teknik insersiyon yerinde P-elementinden olan DNA dizilerinin yardımıyla ilgili gen(ler)i klonlamaya götürücü bir rota olarak hizmet görebildiği kadar (4, 14, 42, 43), aynı zamanda bir dokudaki gen ekspresyon kalıplarını analiz etmek için kullanılabilir (20, 21).

Ayrıca, artırıcı tuzağı mutajenik bir ajan olarak da hizmet görebilir, mesela, transpoze olan gen hücre-spesifik bir genin kodlayan bölgesine insersiyon yaparsa, o kodlayan dizileri bozabilir ve ilgili genin inaktivasyonuna yol açabilir (44).

Alternatif olarak, çevreleyen DNA değişen dizilerle yer değiştirdiği deneylerde çift zincir DNA kırıkları oluşturmak için olduğu kadar (45), tam ve tam olmayan eksizyon (46, 47) ve lokal sıçratma (48, 49) için de kullanılabilir.

Özellikle, GAL4/UAS ikinci nesil artırıcı tuzağı metodu ekstra avantajlara sahip ve önceki artırıcı tuzağı metodunun yol açtığı zorlukları gideren ikili bir sistemdir (18). Birinci olarak, bir transgenin ektopik ekspresyonunun birçok farklı dokulara ve hücre tiplerine yönlendirilebildiği bireysel dizilerin hızla üretilmesine imkan verir. İkinci olarak, transgeni transkripsiyonel aktivatöründen ayırır ki bu da potansiyel olarak hasar verici kontraktlar için uzun zaman zarfında çoğalmayı önleyen değiştiriciler geliştirmeksizin insersiyon için faydalı bir araç sağlar. Üçüncü olarak, hedef geni farklı hücre ve doku tiplerinde istenen hedefi taşıyan tek bir diziyile çaprazlamayla aktifleştirir.

Bununla beraber, artırıcı deteksiyonu aynı zamanda birçok hücre ve doku-spesifik regülatör elementlerin belirlenmesini mümkün kılar. Eğer özel ilgilenilen hücrelerde ekspresyonu düzenleyen elementler belirlenirse, onlar muteakiben ya ablasyonu ile veya özel hücrelerin doğasını değiştirmeye izin veren hücrel değiştiricilerin ekspresyonunu sağlamak için kullanılabilir ki bu da bu hücrelerin organizmadaki fonksiyonuyla ilgili spesifik soruların sorulmasına olanak verir (23, 24, 50, 51).

Artırıcı tuzakları genellikle iki tarzda uygulanır. Birinci olarak, çevreleyen genomik DNA'nın plazmid kurtarma işlemine tabi tutulmasıyla potansiyel olarak yeni genlere bir rota verebilir. İkinci olarak, 2. nesil GAL4 (bir maya transkripsiyon faktörü) dizilerinde alternatif genetik kontraktların belli hücrelerde direkt ekspresyonunda kullanılabilir (50, 25). Bununla beraber, ekspresyon kalıplarının kendileri yeterli miktar dizilerin taranması yapılarak,

*Drosophila* beyinciği ve Malpigi tübüllerinde olduğu gibi (20, 21), bir dokunun formal gen ekspresyon alt-bolgelerinin haritalanmasında kullanılabilir. Bu kullanımda çok miktarda bağımsız artırıcı tuzağı dizisi çalışılan bir dokunun faydalı bir işlevsel genetik haritasını ortaya çıkarabilir. Bu teknik daha sonra onların karakterizasyonuna sebep olsa bile, raportör genin entegrasyon bölgesinin yakınındaki transkripsiyon ünitelerine bağımlı değildir.

### ARTIRICI TUZAĞI TEKNİĞİNİN DEZAVANTAJLARI VE ZORLUKLARI

Artırıcı tuzağı, yukarıda sayılan avantajlarına rağmen, tamamen sorunsuz da değildir. Artırıcı tuzağı verilerinin yorumunda dikkatli olmak gerekmektedir. P-elementlerinin genoma rastgele insersiyon yapmadığı genel olarak kabul edilmektedir (52), ve raportör genin ekspresyon kalıbı komşu transkripsiyon ünitesinin ekspresyonunu tamamen yansıtmayabilir. Artırıcı tuzağı raportör geni büyük oranda kısa mesafede sadece komşu transkripsiyon ünitesinin ekspresyonuna katkıda bulunan kontrol elementleri tarafından etkilenebilir. Bunun etkisi otantik transkripsiyon ünitesininkinden daha dar spasyel gen ekspresyon kalıbını rapor etmektir. Bu nedenle, ilginç raportör gen ekspresyon kalıplarıyla ilişkili transkripsiyon ünitelerini belirleme girişimleri çok komplekstir; ya komşu gen kısmen genel olarak ifade edildiği için, ya da artırıcı detektörü öyle uzak bir mesafeden genoma insersiyon yaptığından dolaydır ki ilgili transkripsiyon ünitesi bulunamayabilir veya net olarak belirlenemeyebilir.

### SONUÇ

Bir artırıcı detektörü (sentetik raportör P-elementi) açık ve tekrarlayan bir ekspresyon kalıbını rapor ettiğinde, bu onun organizmadaki bir genetik ekspresyon bölgesi sınırını gösterebilen bir kontrol elementi veya kontrol elementleri

kombinasyonunun etkisi altında olduğunu gösterir. Şayet birden fazla insersiyon olayı aynı ekspresyon kalıbını rapor ettiğinde bu daha da kuvvet kazanır. Bu yolla, çok sayıda bağımsız artırıcı tuzağı dizileri taraması, çalışılmakta olan bir dokuda fonksiyonel sınırların yararlı bir göstergesini sağlar. Bu teknik, daha sonra onların karakterizasyonuna götürse de, komşu transkripsiyon ünitelerinin tam içeriklerinden oldukça bağımsızdır.

### KAYNAKLAR

1. Rubin GM. *Drosophila melanogaster* as an experimental organism. Science. 1988; 240: 1453-1459.
2. Rubin GM, Spradling AC. Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. Science. 1982; 218: 348-353.
3. O'Kane CJ, Gehring WJ. Detection in situ of genomic regulatory elements in *Drosophila*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1987; 84: 9123-9127.
4. Bellen HJ, O'Kane C, Wilson C, Grossniklaus U, Pearson, RK, Gehring WJ. P-element-mediated enhancer detection: a versatile method to study development in *Drosophila*. Genes and Development. 1989; 3:1288-1300.
5. Finnegan DJ. Transposable elements. Current Opinion in Genetics and Development. 1992; 2: 861-867.
6. Engels WR. The origin of P elements in *Drosophila melanogaster*. BioEssays. 1992; 14: 681-686.
7. Rio DC. Regulation of *Drosophila* P element transposition. Trends in Genetics. 1991; 7: 282-287.
8. Engels WR. The P family of transposable elements in *Drosophila*. Annu Rev Genet. 1983; 17: 315-344.

9. Engels WR. P elements in *Drosophila melanogaster*. In: Berg DE, Howe MM (editörler). *Mobile DNA*. American Society for Microbiology. 1989: 437-484.
10. SENTRY JW, KAISER K. P-element transposition and targeted manipulation of the *Drosophila* genome. *Trends In Genetics*. 1992; 8: 329-331.
11. LASKI FA, RIO DC, RUBIN GM. Tissue specificity of *Drosophila* P element transposition is regulated at the level of mRNA splicing. *Cell*. 1986; 44: 7-19.
12. ROBERTSON HM, PRESTON CR, PHILLIS RW, JOHNSON-SCHLITZ DM, BENZ WK, ENGELS WR. A stable source of P element transposase in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. 1988; 118: 461-470.
13. SPRADLING AC, RUBIN GM. Transposition of cloned P elements into *Drosophila* germ line chromosomes. *Science*. 1982; 218: 341-347.
14. BIER E, VAESSIN H, SHEPHERD S, LEE K, MCCALL K, BARBEL S, ACKERMANN L, CARRETTO R, UEMURA T, GRELL E, JAN LY, JAN LN. Searching for pattern and mutation in the *Drosophila* genome with a P-lacZ vector. *Genes and Development*. 1989; 3: 1273-1287.
15. WILSON C, PEARSON PK, BELLEN HJ, O'KANE CJ, GROSSNIKLAUS U, GEHRING WJ. P-element-mediated enhancer detection: Isolation and characterization of developmentally regulated genes in *Drosophila*. *Genes and Development*. 1989 3: 1301-1313.
16. FISCHER JA, GINIGER E, MANIATIS T, PTASHNE M. GAL4 activates transcription in *Drosophila*. *Nature*. 1988; 332: 853-856.
17. GREIG S, AKAM A. Homeotic genes autonomously specify one aspect of pattern in the *Drosophila* mesoderm. *Nature*. 1993; 362: 630-632.
18. BRAND AH, PERRIMON N. Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*. 1993; 118: 401-415.
19. KAISER K. Transgenic *Drosophila* - 2nd-generation enhancer traps. *Current Biology*. 1993; 3: 560-562.
20. YANG MY, ARMSTRONG JD, VILINSKY I, STRAUSFELD NJ, KAISER K. Subdivision of the *Drosophila* mushroom bodies by enhancertrap expression patterns. *Neuron*. 1995; 15: 45-54.
21. SOZEN MA. Mapping domains of gene expression in the Malpighian tubule of *Drosophila melanogaster* by enhancer trapping. Doktora tezi. Glasgow: University of Glasgow, 1996.
22. SOZEN MA, ARMSTRONG JD, YANG M-Y, KAISER K, DOW JA. Functional domains are specified to single-cell resolution in the Malpighian tubule of *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997; 94: 5207-5212.
23. BELLEN JH, WILSON C, GEHRING WJ. Dissecting the complexity of the nervous system by enhancer detection. *BioEssays*. 1990; 12: 199-204.
24. SMITH HK, O'KANE CJ. Use of a cytoplasmically localised P-lacZ fusion to identify cell shapes by enhancer trapping in *Drosophila*. *Roux's Archives of Developmental Biology*. 1991; 200: 306-311.
25. MOFFAT KG, GOULD JH, SMITH HK, O'KANE CJ. Inducible cell ablation in *Drosophila* by cold-sensitive ricin-A chain. *Development*. 1992; 114: 681.
26. FERVEUR JF, STORTKUHLE KF, STOCKER RF, GREENSPAN RJ. Genetic feminisation of brain structures and changed sexual orientation in male *Drosophila melanogaster*. *Science*. 1995; 267: 902-905.
27. ROSAY P, DAVIES SA, YU Y, SOZEN MA, KAISER K, DOW JA. Cell-type specific calcium signalling in a *Drosophila* epithelium. *J Cell Sci*. 1995; 110: 1683-1692.

28. Bertram MJ, Akerkar GA, Ard RL, Gonzalez C, Wolfner MF. Cell type-specific gene expression in the *Drosophila melanogaster* male accessory gland. *Mechanisms of Development*. 1992; 38: 33-40.
29. Hartenstein V, Jan YN. Studying *Drosophila* embryogenesis with P-lacZ enhancer trap lines. *Roux's Archives of Developmental Biology*. 1992; 201: 194-220.
30. Riesgo-Escovar J, Woodard C, Gaines P, Carlson J. Development and organization of the *Drosophila melanogaster* olfactory system: An analysis using enhancer traps. *Journal of Neurobiology*. 1992; 23: 947-964.
31. Doe CQ, ChuLaGraff Q, Wright DM, Scott MP. The prospero gene specifies cell fates in the *Drosophila* central nervous system. *Cell*. 1991; 65: 451-464.
32. Nose A, Mahajan VB, Goodman CS. Connectin: A homophilic cell adhesion molecule expressed on a subset of muscles and the motoneurons that innervate them in *Drosophila*. *Cell*. 1992; 70: 553-567.
33. Schubiger M, Feng Y, Fambrough DM, Palka J. A mutation of the *Drosophila* sodium pump alpha subunit gene results in bang-sensitive paralysis. *Neuron*. 1994; 12: 373-381.
34. Soininen R, Schoor M, Henseling U, Tepe C, Kisters-Woike B, Rossant J, Gossler A. The mouse Enhancer trap locus 1 (Etl- 1): A novel mammalian gene related to *Drosophila* and yeast transcriptional regulator genes. *Mechanisms of Development*. 1992; 39: 111-123.
35. Scott EK, Baier H. The cellular architecture of the larval zebrafish tectum, as revealed by gal4 enhancer trap lines. *Front Neural Circuits*. 2009; 3: 13.
36. Kawakami K, Abe G, Asada T, Asakawa K, Fukuda R, Ito A, Lal P, Mouri N, Muto A, Suster ML, Takakubo H, Urasaki A, Wada H, Yoshida M. zTrap: zebrafish gene trap and enhancer trap database. *BMC Dev Biol*. 2010; 18: 10:105.
37. Devic M, Delseny M, Gallois P. Promoter trapping in *Arabidopsis thaliana* - searching for embryo-specific genes. *Comptes Rendus Des Seances De La Societe De Biologie Et De Ses Filiales*. 1992; 186: 541-549.
38. Lindsey K, Wei WB, Clarke MC, Mcardle HF, Rooke LM, Topping JF. Tagging genomic sequences that direct transgene expression by activation of a promoter trap in plants. *Transgenic Research*. 1993; 2: 33-47.
39. Topping JF, Agyeman F, Henricot B, Lindsey K. Identification of molecular markers of embryogenesis in *Arabidopsis thaliana* by promoter trapping. *Plant Journal*, 1994; 5: 895-903.
40. Gardner MJ, Baker AJ, Assie JM, Poethig RS, Haseloff JP, Webb AA. GAL4 GFP enhancer trap lines for analysis of stomatal guard cell development and gene expression. *J Exp Bot*. 2009; 60(1): 213-26.
41. Chudalayandi S. Enhancer trapping in plants. *Methods Mol Biol*. 2011; 701: 285-300.
42. Bingham PM, Levis R, Rubin GM. The cloning of the DNA sequences from the white locus of *Drosophila melanogaster* using a novel and general method. *Cell*. 1981; 25: 693-704.
43. Searles LL, Jokerst RS, Bingham PM, Voelker RA, Greenleaf AL. Molecular cloning of sequences from a *Drosophila* RNA polymerase II locus by P element transposon tagging. *Cell*. 1982; 31: 585-592.
44. Davies SA, Kelly DC, Goodwin SF, Yang S, Sozen MA, Kaiser K, Dow JA. Analysis of vha55, the gene encoding the V-ATPase B-subunit in *Drosophila melanogaster* reveals a novel role for proton pumping in transcriptional silencing by Polycomb. *J of Biol Chem*. 1996; 271: 30677-30684.
45. Gloor, GB, Nassif NA, Johnson-Schlitz DM, Preston CR, Engels WE. Targeted genes replacement in *Drosophila* via P element-induced gap repair. *Science*. 1991; 253: 1110-1117.



46. . Tsubota S, Schedl P. Hybrid dyssgenesis-induced revertants of insertions at the 5' end of the rudimentary gene in *Drosophila melanogaster*: transposon-induced control mutations. *Genetics*. 1986; 114: 165-182.
47. Salz HK, Cline TW, Schedl P. Functional changes associated with structural alterations induced by mobilization of aP element inserted in the sex-lethal gene of *Drosophila*. *Genetics*. 1987; 117: 221-231.
48. Tower J, Karpen JH, Craig N, Spradling AC. Preferential transposition of *Drosophila* P elements to nearby chromosomal sites. *Genetics*. 1993; 133: 347-359.
49. Zhang P, Spradling AC. Efficient and dispersed local Pelement transposition from *Drosophila* females. *Genetics*. 1993; 133: 361-373.
50. O'Dell KM, Armstrong JD, Yang, MY, Kaiser K. Functional dissection of the *Drosophila* mushroom bodies by selective feminization of genetically defined subcompartments. *Neuron*. 1995; 15: 55-61.
51. Sentry JW, Yang MM, Kaiser K. Conditional cell ablation in *Drosophila*. *Bioessays*. 1993; 15: 491-493.
52. Smith D, Wohlgemuth J, Calvi BR, Franklin I, Gelbart WM. hobo Enhancer trapping mutagenesis in *Drosophila* reveals an insertion specificity different from P elements. *Genetics*. 1993; 135: 1063-1076.