

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Molekulární biologie a biochemie organismů

Speciální chemicko-biologické obory



Tomáš Soukup

GAL4/UAS binární systém jako nástroj pro studium genové funkce

GAL4/UAS binary system as a tool for the study of gene function

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Ing. Vladimír Krylov, Ph.D.

Praha, 2014

Poděkování

Vypracování této práce by se nemohlo uskutečnit bez obětavé podpory mé rodiny a mých nejbližších; nejen během psaní tohoto textu, ale i během celého studia. Jim patří mé poděkování. Děkuji také svému školiteli, RNDr. Ing. Vladimíru Krylovi, PhD., za dohled nad průběhem tvorby celé bakalářské práce a za rady a konstruktivní kritiku, kterou mi poskytl.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 12. května 2014

Tomáš Soukup

Abstrakt

GAL4/UAS systém je bipartitním nástrojem genového inženýrství, umožňujícím ektopickou expresi *in vivo* v časovém i tkáňově specifickém kontextu. Design této techniky vychází z mechanismů regulace genové transkripce, objasněných z veliké části experimentálními studii regulace metabolického okruhu pro zpracování galaktosy organismu *Saccharomyces cerevisiae*. Nezávislou inkorporací genu pro transkripční faktor Gal4p a jeho vazebné sekvence (*UAS*) za pomoci transposibilních technik a technik pro integraci do specifické části genomu je možné generovat stovky stabilních, transgenních linií. Křížením jedince z *GAL4* linie s jedincem z *UAS* linie lze následně získat jedince, vykazujícího za vhodných, regulovatelných podmínek ektopickou expresi. Tato práce představuje syntézu základních principů *GAL4/UAS* systému a jeho variant, adaptovaných zejména pro potřeby genových manipulací s modelovými organismy *Drosophila melanogaster* a *Danio rerio*. Dále tento text shrnuje propojení *GAL4/UAS* systému s dalšími technikami a ve stručnosti poukazuje na možnosti praktické aplikace zejména na poli neurologie.

Klíčová slova: GAL4, UAS, kvasinka, genová funkce, genový mozaicismus, transgenní linie, ektopická exprese

Abstract

GAL4/UAS system is a bipartite gene engineering tool, enabling ectopic expression in temporal and tissue-specific manner *in vivo*. Design of this technique is based on a mechanism of gene transcription, which was elucidated of large portion by an experimental study of *Saccharomyces cerevisiae* regulation of metabolic control circuit for processing galactose. It is possible to generate hundreds of stable transgenic lines by independent incorporation of the gene for the transcription factor Gal4p and its binding sequence (*UAS*), respectively, by using transposable or specific-sequence integration techniques. An individual organism, manifesting ectopic expression in suitable, adjustable conditions, can be obtained by cross breeding individual of *GAL4* lines with individual from *UAS* line. This thesis represents a synthesis of the basic principles of *GAL4/UAS* system and its variants, particularly adapted to the needs of genetic manipulation of model organisms *Drosophila melanogaster* and *Danio rerio*. Additionally, this text summarizes the connection *GAL4/UAS* system with other techniques and briefly highlights the potential for practical applications mainly in research area of neurology.

Klíčová slova: GAL4, UAS, yeast, gene function, genetic mosaicism, transgenic lines, ectopic expression

Obsah

Seznam zkratk	1
Úvod	3
1. Základní komponenty <i>GAL4/UAS</i> systému	4
1.1. Metabolismus galaktosy <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4
1.2. Regulace metabolismu galaktosy <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5
2. <i>GAL4/UAS</i> expresní systém	7
2.1. Princip	7
2.2. Tvorba transgenních linií	8
2.3. Základní formy regulace / modifikace	12
2.4. Komplexní techniky genového mozaicismu	17
2.5. Propojení s odlišnými bipartitními systémy	23
3. Aplikace <i>GAL4/UAS</i> systému v základním výzkumu	26
3.1. Identifikace funkce genů a řídicích elementů genové exprese	26
3.2. Metody vizualizace	28
3.3. Neurobiologie	29
Závěr	31
Literatura	32

Seznam zkratek

C-MARCM	Coupled M osaic A nalysis with R epressible C ell M arker
CNS	Central N eurone S ystem
dBrainbow	D rosophila B rainbow
DEC-MARCM	D ual E xpression C ontrol M ARCM
DES	d iethylstilbestrol
ET	E nhancer T rap
ER	E strogene R eceptor
EcR	E cdysone R eceptor
FB	F lybow
FINGR	E T- F lp- I nduced I ntersectional G AL80/ G AL4 R epression
FP	F luorescent P roteins
FRT	F lippase R ecognition T arget
G-TRACE	G al4p T echnique for R eal-time and C lonal E xpression
GFP	G reen F luorescent P rotein
GT	G ene T rap
Gal4p-AD	G al4p A ctivation D omain
Gal4p-DBD	G al4p D N A - B inding D omain
hsp70	h eat s hock p rotein 70
Chr2	C hannelrhodopsin- 2
ID-MARCM	I ndependent D ouble M osaic A nalysis with R epressible C ell M arker
LexA-DBD	L exA D N A - B inding D omain
LexAop	L exA O perator
MARCM	M osaic A nalysis with R epressible C ell M arker
MAZe	M osaic A nalysis in Z ebrafish
NHEJ	N on- H omologous E nd J oining
PT	P rotein T rap
Q-MARCM	Q -system M osaic A nalysis with R epressible C ell M arker
QUAS	Q -system U pstream A ctivating S equence
rtTA	r everse t et-responsive T rans- A ctivator
SA	S plice A ceptor
SAGA	S pt- A da- G CN5- A cetyltransferasa
SD	S plice D onor
sgRNA	s hort g uide R N A
TALEN	T ranscription A ctivator- L ike E ffector N uclease

Tet-systém	T etracycline system
TetA	T etracycline A ntiporter
tetO	T etracycline O perator
TetR	T etracycline R epressor
TS-MARCM	T win S pot M osaic Analysis with R epressible C ell M arker
TSG	T win S pot G enerator
tTA	t et-responsive T rans- A ctivator
UAS	U pstream A ctivating S equence
URS	U pstream R epression S equence
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktosid
Y2H	Y east 2 (two) H ybrid System
ZFN	Z inc F inger N uclease

Úvod

Problematika technického provedení, metodiky vědeckých experimentů a snaha o jejich optimalizaci je sama o sobě zdrojem různorodých úhlů vzhledu do zákonitostí přírodních jevů. Vědecké metody, konstruované v souladu s experimentálním designem, jsou však jen jedním aspektem vědeckého bádání - nosným lešením, které podpírá fakta a teorie, získané těmito metodami. Za horizontem experimentálních nástrojů leží nedozírná oblast myriád teorií, zahrnující i velice slibné myšlenky, jejichž platnost však není možné se současnou technologickou úrovní prokázat. Invence a úsilí, věnované vývoji nových metod, nejsou dekadentním honem za co nejkomplexnějším nástrojem. Vývoj nových technik je poháněn objevy na poli přírodních dějů, tyto objevy jsou pak naopak umožněny dokonalejšími nástroji a technologickým pokrokem.

Poslední dvě dekády je oblast biologického bádání svědkem obrovského nárůstu objevů, staré znalosti se vklíňují do nových kontextů. Významným nástrojem, který pomohl mnohé z těchto znalostí „vydobýt“, je *GAL4/UAS* expresní systém; technika, založená na binárním provedení, která umožňuje ektopickou expresi, jíž lze – narozdíl od mnoha předešlých technik – načasovat a také směřovat do specifické oblasti tkání. Četné modifikace *GAL4/UAS* expresního systému a tisíce dostupných transgenních linií pro mnoho druhů organismů vytvořily během dvou desetiletí z této techniky silný nástroj genového inženýrství, jehož uplatnění dalece přesahuje základní výzkum.

1. Základní komponenty *GAL4/UAS* systému

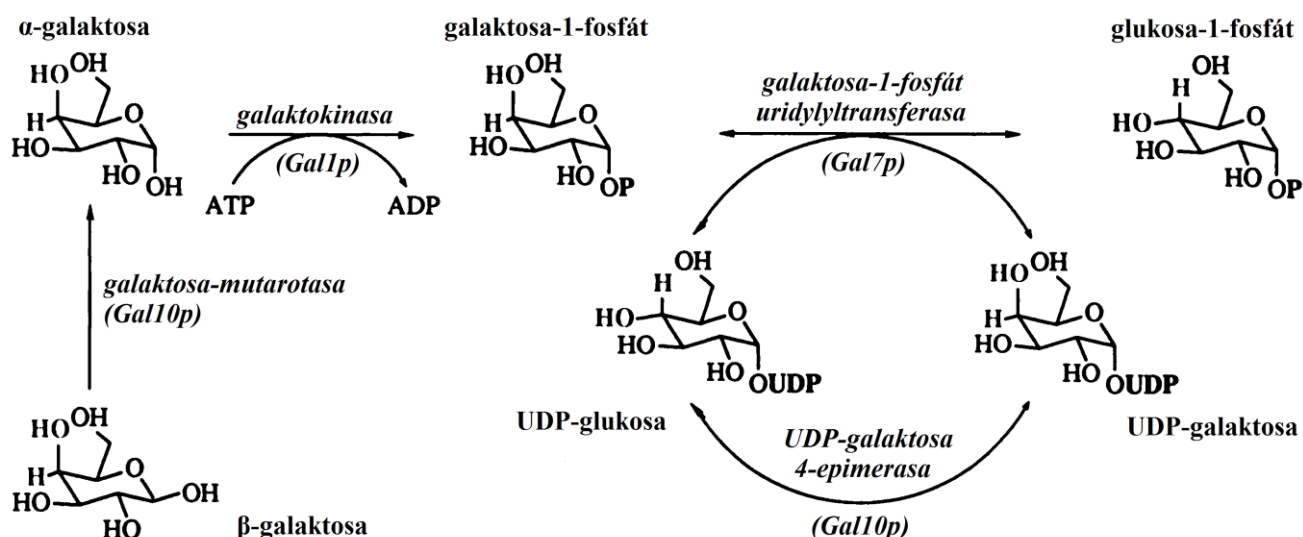
1.1. Metabolismus galaktosy *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae je vřeckovýtrusná kvasinka, schopná metabolizovat rozličné druhy cukrů. Metabolismus galaktosy (6-(hydroxymethyl)oxan-2,3,4,5-tetrol) (viz obr. 1) - známý také jako Leloirova dráha - je v kontextu zpracování zdrojů uhlíku unikátní zejména tím, že jeho mašinerie je aktivována pouze v přítomnosti galaktosy, zatímco přítomnost glukosy činnost této metabolické větve reprimuje (STEPHENSON and YUDKIN 1936). Mechanismus této regulace se stal modelovým systémem pro studium regulace genové exprese eukaryotních organismů (GINIGER *et al.* 1985).

Enzymy, podílející se na metabolizaci galaktosy (Gal7p, Gal10p, Gal1p), jsou kódovány strukturálními geny *GAL7*, *GAL10* a *GAL1* (shrnuto v JOHNSTON 1987), nalézajícími se (v tomto pořadí) v genové vazbě na chromozomu II (BASSEL and MORTIMER 1971). Jejich exprese je řízena produkty regulačních genů *GAL3*, *GAL4* a *GAL80* (shrnuto v JOHNSTON 1987).

Transport β -D-galaktosy do buňky zajišťuje galaktopermeasa (Gal2p), kódovaná genem *GAL2* (TSCHOPP *et al.* 1986). Gal2p je schopna vázat kromě galaktosy také některé její analogy (CIRILLO 1968), včetně glukosy (TSCHOPP *et al.* 1986). *GAL2* vykazuje bazální úroveň transkripce, transport galaktosy (popř. jejích analogů) probíhá proto při nízkoafinitní vazbě usnadněnou difúzí i v nepřítomnosti primárního substrátu (CIRILLO 1968). Přítomnost galaktosy indukuje řádový vzrůst transkripce Gal2p, v kooperaci s galaktokinasou (Gal1p) jsou substráty galaktopermeasy vázány s vysokou afinitou a rychlost transportu vzrůstá (RAMOS *et al.* 1989).

Po přenosu do buňky je β -izomer galaktosy konvertován v α -izomer mutarotasovou (aldosa-1-epimerasovou) aktivitou Gal10p (EC: 5.1.3.2, 5.1.3.3) (MAJUMDAR *et al.* 2004). Gal10p je unikátní svou bispecifickou povahou – kromě mutarotasové aktivity (v C-terminální doméně) vykazuje vůči galaktose také epimerasovou aktivitu (N-terminální doména) (MAJUMDAR *et al.* 2004), uplatňující se v pozdějších krocích Leloirovy dráhy (DOUGLAS and HAWTHORNE 1964). V dalším kroku je α -D-galaktosa konvertována (za hydrolýzy ATP) galaktokinasou (Gal1p; EC: 2.7.1.6) na galaktosa-1-fosfát (SCHELL and WILSON 1977). Gal1p podmiňuje také fungování již zmíněného vysokoafinitního transportu galaktosy a dalších cukrů do intracelulárního prostředí, v nepřítomnosti Gal3p je schopna regulovat expresi GAL specifických genů (viz dále). Poslední krok Leloirovy dráhy katalyzuje galaktosa-1-fosfát uridylyltransferasa (Gal7p; EC: 2.7.7.12) (DOUGLAS and HAWTHORNE 1964). Galaktosa-1-fosfát reaguje s UDP-glukosou, přenesením uridinmonofosfátu (UMP) vzniká UDP-galaktosa a glukosa-1-fosfát (WONG and FREY 1974). Tato reakce je spřažena s konverzí UDP-



Obr. 1 – schéma metabolismu galaktosy *S. cerevisiae*; převzato z FREY 1996, upraveno

galaktosy na UDP-glukosu UDP-galaktosa-4-epimerasou (Gal10p; EC: 5.1.3.2, 5.1.3.3) (DOUGLAS and HAWTHORNE 1964). Glukosa-1-fosfát je výchozím substrátem pro glykolytický cyklus.

1.2. Regulace metabolismu galaktosy *Saccharomyces cerevisiae*

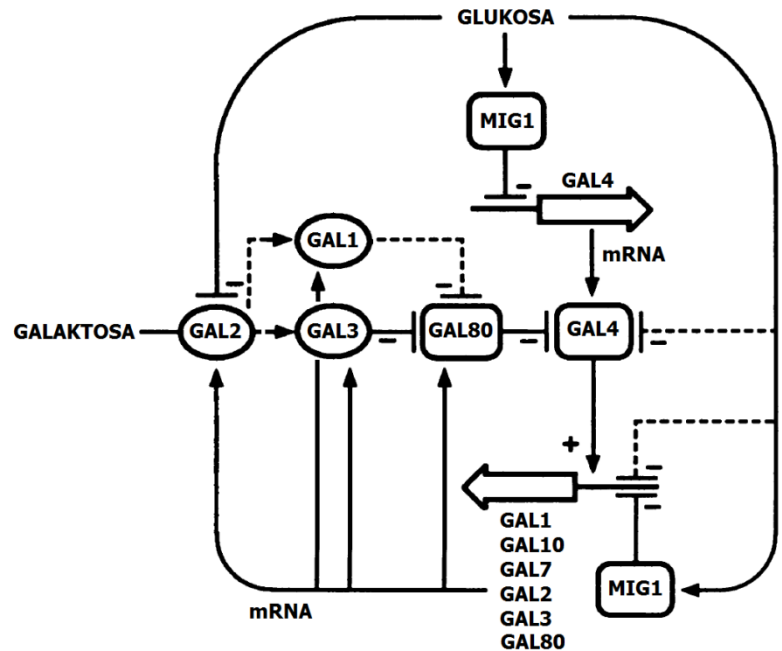
Metabolismus galaktosy u *Saccharomyces cerevisiae* (i dalších organismů) podléhá striktní regulaci. Preferovaným zdrojem uhlíku je glukosa, teprve v případě její absence a za přítomnosti galaktosy dochází k indukci exprese strukturálních GAL genů (DOUGLAS and HAWTHORNE 1966). Transkripci těchto genů iniciuje transkripční faktor Gal4p, kódovaný genem *GAL4* (KLAR and HALVORSON 1974; GINIGER *et al.* 1985). Gal4p se ve formě dimeru (Carey *et al.*, 1989) váže motivem Cys₂His₆ zinkového prstu ve své DNA-vazebné doméně (Gal4p-DBD) (shrnutí v LIANG *et al.* 1996) na GAL specifickou regulační sekvenci, zvanou „upstream activating sequence“ (*UAS*) (GUARENTE *et al.* 1982). Vazbou dalších transkripčních faktorů a remodelací chromatinu umožňuje Gal4p nasednutí RNA polymerasy II na promotor a zahájení transkripce. V nepřítomnosti galaktosy je aktivita Gal4p inhibována represorem Gal80p, jehož aktivita je regulována signalizačním Gal3p (viz dále).

UAS je regulační element semipalindromického charakteru, podobný klasickým enhancerům, narozdíl od nich je ale schopen aktivovat transkripci jen v případě své lokalizace před promotorem (STRUHL 1984). Síla vazby Gal4p k *UAS* je proměnlivá, kromě zdroje uhlíku závisí na počtu *UAS* elementů v rámci jednoho promotoru, na jejich vzájemné vzdálenosti (MELCHER and XU 2001) a primární struktuře (LIANG *et al.* 1996). Exprese genu pod kontrolou *UAS* elementů je determinována jejich lokalizací v kontextu terciární struktury DNA. Je-li mezi *UAS* elementy vzdálenost, odpovídající jedné otočce helixu (10,4 bp – B-konformace DNA), dochází k tvorbě vazby mezi molekulami represoru Gal80p a k posílení jejich funkce, exprese genu je kompletně potlačena (MELCHER and XU 2001). V případě indukce dochází kooperační vazbou molekul Gal4p k řádovému navýšení exprese

(GINIGER and PTASHNE 1988; MELCHER and XU 2001). V přítomnosti jednoho UAS elementu vykazuje gen bazální expresi i v reprimovaném stavu, indukci se hladina exprese zvyšuje relativně málo (MELCHER and XU 2001).

Aktivita GAL regulačního aparátu je determinována zdrojem uhlíku. Přítomnost glukosy iniciuje katabolickou represi - aktivita metabolismu galaktosy je potlačena několika cestami (viz obr. 2), vykazujícími synergistické tendence (JOHNSTON *et al.* 1994). Zásadní podíl na inhibici má transkripční represor Mig1p. Vzrůst hladiny glukosy v buňce indukuje signální kaskádu, vedoucí k translokaci defosforylovaného Mig1p do jádra (DE VIT *et al.* 1997), který vazbou k tzv. „upstream repression sequence“ (URS) a iniciací formování represivního komplexu zabraňuje transkripci (NEHLIN and RONNE 1990; DE VIT *et al.* 1997). Přímá inhibice na úrovni transkripce probíhá zejména u genu *GAL4*, URS byla zjištěna také u *GAL1* a *GAL3*, které této represi zřejmě také podléhají (LUNDIN *et al.* 1994). Ostatní GAL specifické geny jsou inhibovány absencí Gal4p (NEHLIN *et al.* 1991). V přítomnosti některých zdrojů uhlíku (např. glycerolu nebo rafinosy) je GAL systém reprimován, zároveň však nedochází k indukci strukturních a regulačních genů (shrnuto v LOHR *et al.* 1995). Gal4p je v tomto stavu vázán k UAS svou DNA vazebnou doménou (KEEGAN *et al.* 1986), jeho aktivita je vazbou na jednu z aktivačních domén (MA and PTASHNE 1987a) blokována represorem Gal80p ve formě dimeru (MA and PTASHNE 1987b; MELCHER and XU 2001).

Přítomnost galaktosy jako výhradního zdroje uhlíku indukuje spolu s ATP aktivitu signálního proteinu Gal3p. Dříve prosazovaný katalytický model přisuzoval Gal3p roli enzymu, zodpovědného za konverzi galaktosy v signalizační molekulu, destabilizující inhibiční účinky Gal80p v jádře. Na základě pozorování Gal1p, schopné indukovat GAL metabolismus i za nepřítomnosti Gal3p byl zaveden předpoklad, že touto signalizační molekulou je galaktosa-1-fosfát (shrnuto v BHAT and MURTHY 2001). Pozdějšími studiemi byl však katalytický model vyvrácen a bylo prokázáno, že inhibiční aktivitu represoru Gal80p destabilizuje samotný protein Gal3p (model protein-proteinové interakce). Stejně schopnosti vykazuje také bifunkční enzym Gal1p, podílející se na mohutné odezvě GAL aparátu po indukci galaktosou (BHAT and HOPPER 1992). Recentní studie naznačují, že esenciálním faktorem v inhibici represoru Gal80p je permanentní lokalizace signálního proteinu Gal3p v jádře buňky i během absence galaktosy (EGRIBOZ *et al.* 2011). V případě indukce zde patrně



Obr. 2 – schéma regulace metabolismu *S. cerevisiae*; převzato z NEHLIN *et al.* 1991, upraveno

dochází mezi Gal3p a Gal4p ke kompetici o vazbu dimerů/multimerů Gal80p (MELCHER and XU 2001; EGRIBOZ *et al.* 2013). Výsledkem je disociace Gal80p z Gal4p-UAS a tvorba stabilního komplexu Gal3p-Gal80p (EGRIBOZ *et al.* 2011).

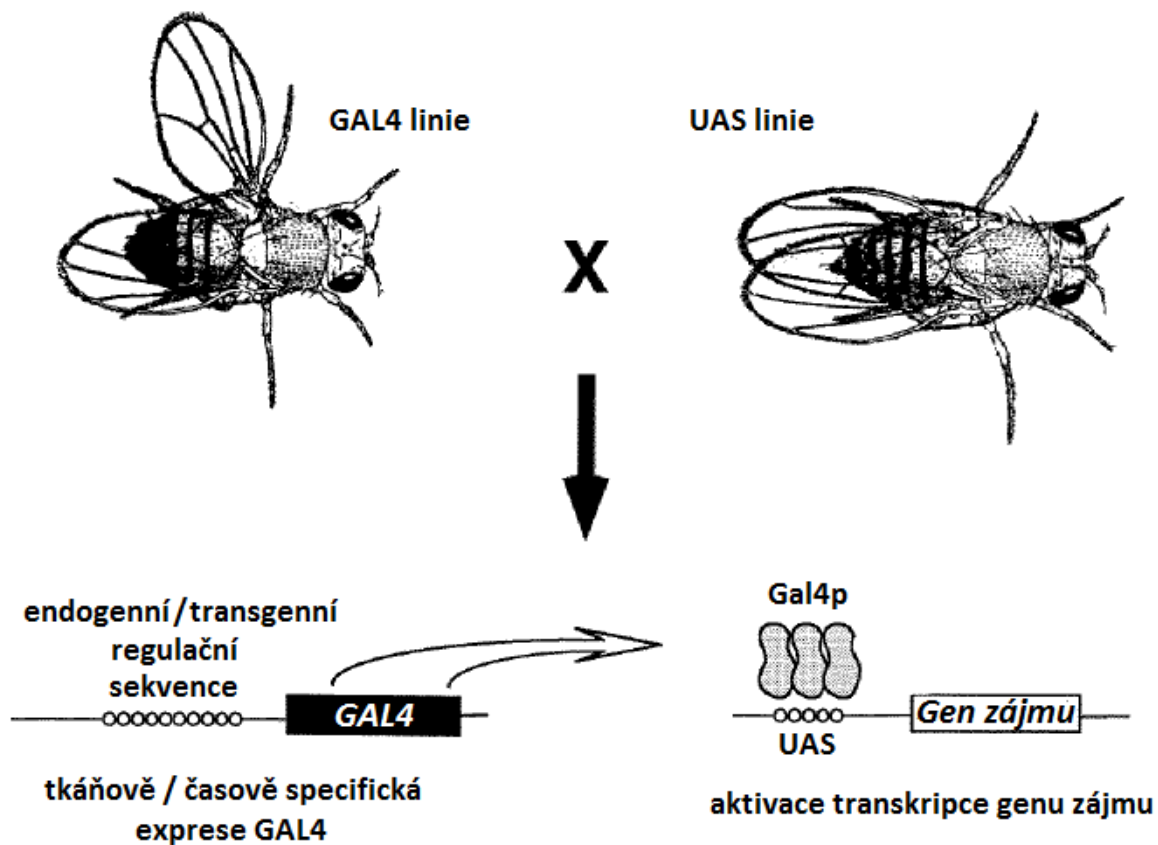
Aktivační doména Gal4p (Gal4p-AD) iniciuje vazbu Spt-Ada-GCN5-acetyltransferasy (SAGA komplex) k UAS. SAGA komplex je zodpovědný za vazbu obecných transkripčních faktorů - mj. TBP (TATA binding protein) a TFIIB – a tvorbu preiniciačního komplexu. Preiniciační komplex vytváří vhodné podmínky pro vazbu RNA polymerasy II do promotoru regulovaného genu a pro iniciaci transkripce tohoto genu (BHAUMIK and GREEN 2001; LARSCHAN and WINSTON 2001).

2. GAL4/UAS expresní systém

2.1. Princip

Odhalení základních principů regulace a fungování transkripce genů, spjatých s metabolismem galaktosy *Saccharomyces cerevisiae* položilo základy úvahám, zda je mechanismus transkripce napříč druhovým spektrem organismů skutečně natolik konzervativní, aby případná transgenní inzerce sekvencí *GAL4* a *UAS* mohla vést k úspěšné expresi genů i u evolučně velmi vzdálených druhů. Tato domněnka byla brzy potvrzena u široké plejády organismů, mj. *Drosophila melanogaster* (Octomilka obecná) (FISCHER *et al.* 1988), *Arabidopsis thaliana* (Huseníček rolní) (MA *et al.* 1988) a *Mus musculus* (Myš obecná) (ORNITZ *et al.* 1991). Expresie pod vlivem transkripčního faktoru Gal4p bylo dosaženo také ve tkáňových kulturách savčích buněk (KAKIDANI and PTASHNE 1988) a lidských HeLa buněk (WEBSTER *et al.* 1988). Další druhy organismů byly testovány na schopnost GAL-specifické transkripce především po zavedení *GAL4/UAS* expresního systému do laboratorní praxe s cílem využít širokých možností, které tento systém nabízí (viz kap. 2.2).

Princip *GAL4/UAS* binárního systému je založen na konstrukci dvou nezávislých linií - *GAL4* linie, regulované endogenní, popř. transgenní regulační sekvencí (promotor, enhancer) a *UAS* linie, regulující expresi endogenního, popř. transgenního genu zájmu. Potomstvo, vzniklé křížením těchto linií, vykazuje ektopickou genovou expresi (viz obr. 3). Gen zájmu je zprostředkovaně exprimován jen v buňkách, pro které je typická aktivita dané regulační sekvence - tím lze omezit expresi genu zájmu na úzce specializovanou tkáň. Volbou vhodné regulační sekvence, indukovatelné jen za definovaných podmínek (např. při určité teplotě), lze pak dosáhnout také časové regulace genu zájmu (FISCHER *et al.* 1988; ORNITZ *et al.* 1991; BRAND and PERRIMON 1993).



Obr. 3 – princip *GAL4/UAS* expresního systému; převzato z BRAND and PERRIMON 1993, upraveno

Poprvé byl tento přístup použit na transgenních myších modelech (ORNITZ *et al.* 1991). Průlomem pro *GAL4/UAS* systém se však stalo jeho spřažení s metodikou „enhancer trap“ (ET) (O’KANE and GEHRING 1987) a „gene trap“ (GT) (GOSSLER *et al.* 1989), která náhodnou integrací transgenní sekvence umožňuje mj. identifikovat dosud neznámé regulační elementy. Tato metoda umožnila relativně snadnou a rychlou generaci odlišných *GAL4* a *UAS* transgenních linií *Drosophila melanogaster* (viz kap 3.1).

GAL4/UAS systém byl zpočátku využíván především pro vizualizaci transkripční aktivity známých a identifikaci nových regulačních sekvencí. Postupné modifikace systému, propojení s dalšími technikami genového inženýrství a prudký nárůst dostupných transgenních linií z něj však učinily nástroj se širokým spektrem aplikací. Dnes jej lze využít např. pro farmakologické studie, ovlivnění reflexů i paměti modelových organismů, popř. pro identifikaci genových interakcí, buněčných pochodů a architektury specifických tkání (viz kap. 3).

2.2. Tvorba transgenních linií

Rozšíření *GAL4/UAS* systému bránila zpočátku především absence linií pro jednotlivé komponenty tohoto nástroje, hlavní překážkou se ale ukázala být integrace *GAL4/UAS* sekvencí do genomu určitých druhů. Relativně snadná konstrukce linií u *Drosophila melanogaster* (FISCHER *et al.* 1988; BRAND and PERRIMON 1993) kontrastovala s obtížemi o dosažení podobných výsledků u *Danio rerio* (Dáňo pruhované) (SCHEER and CAMPOS-ORTEGA 1999; ASAKAWA and KAWAKAMI 2008).

Rané studie využívaly pro konstrukci *GAL4/UAS* linií (*A. thaliana*, tkáňové kultury savčích buněk) tradiční transformační techniky genového inženýrství (FROMM *et al.* 1985; CHEN and OKAYAMA 1987; KAKIDANI and PTASHNE 1988; MA *et al.* 1988). Sofistikovanějším přístupem u *M. musculus* se stala metodika pronukleární mikroinjekce plazmidových vektorů do oplozeného vajíčka (GORDON *et al.* 1980; ORNITZ *et al.* 1991). Vysoká letalita, relativně častý výskyt mozaicismu, repetitivní i vícenásobné integrace (BRINSTER *et al.* 1985), nepřilíš vysoká úspěšnost těchto transformačních postupů a zejména nemožnost efektivní tvorby velkého množství *GAL4/UAS* linií vedly k upřednostnění dalších technik. V současnosti jsou k dispozici efektivní postupy pro náhodnou (transposibilní elementy) i cílenou (homologní rekombinace ad.) integraci *GAL4/UAS* transgenních sekvencí do genomu zejména *Drosophila melanogaster*, *Danio rerio* a *Xenopus laevis / tropicalis* (Drápatka vodní / tropická). Navzdory existenci vhodných integračních technik nejsou *GAL4/UAS* linie u dalších modelových organismů příliš rozšířeny.

Transposibilní elementy jsou mobilní genové sekvence, které se přirozeně nalézají v genomu mnoha organismů napříč celým druhovým spektrem prokaryot i eukaryot. V rámci genomu se transposony, nejčastěji ohraničené invertovanými repeticemi (unikátními pro každý typ transposonu) přesouvají díky aktivitě tzv. transponasy, enzymu, který zajišťuje vyštěpení těchto elementů a jejich reintegraci na jiném (více méně náhodném) místě genomu. *In vivo* je transponasa kódována sekvencí v rámci samotného transposonu (autonomní transposibilní element). Pro tvorbu stabilních *GAL4/UAS* linií jsou využívány plazmidové vektory, které obsahují modifikované DNA transposony II. typu, fungující na principu *cut and paste* a jejichž sekvence pro transponasu je nahrazena transgenní sekvencí (neautonomní transposibilní element). Specifická transponasa je spolu s transposibilním plazmidovým vektorem vnášena ve formě autonomní genetické sekvence, mRNA nebo samotného enzymu (shrnutí ve VENKEN and BELLEN 2007). První studie využívaly pro inkorporaci *GAL4/UAS* sekvencí do genomu *Drosophila melanogaster* vektory, založené na tzv. *P-elementech*, vůbec prvních transposonech, identifikovaných u vyšších eukaryot (SPRADLING and RUBIN 1982). Preference *P-elementárních* transposonů pro integraci do 5' regulačních oblastí genů (SPRADLING *et al.* 1995) byla využita při konstrukci linií v rámci metody ET a GT (COOLEY *et al.* 1988; BRAND and PERRIMON 1993; LUKACSOVICH *et al.* 2001). *P-elementy* jsou – zřejmě kvůli potřebě specifických faktorů - funkční jen v buňkách *Drosophila melanogaster* (KHILLAN *et al.* 1985). Za účelem dosažení podobné aplikace u obratlovců byl na základě dostupných fylogenetických dat vytvořen z neaktivní transposibilní sekvence čeledi *Salmonidae* transposibilní element *Sleeping Beauty* (IVICS *et al.* 1997). Úspěšná tvorba transgenních linií použitím tohoto elementu u *M. musculus* (DUPUY *et al.* 2001), *Danio rerio* (DAVIDSON *et al.* 2003) a *X. laevis* (SINZELLE *et al.* 2006) byla zastíněna několika nevýhodami, zejména omezenou velikostí integrované sekvence a potenciální inhibicí transpozice při nadprodukcí *Sleeping Beauty* transponasy (KARSI *et al.* 2001; GEURTS *et al.* 2003). Alternativou se stalo použití *Tol2* transposonu, jediného aktivního transposibilního elementu u obratlovců,

izolovaného z genomu paprskoploutvé ryby *Oryzias latipes* (KAWAKAMI *et al.* 1998). Oba druhy transposibilních elementů vykazují vysokou (20-30%) míru integrace (DAVIDSON *et al.* 2003; SINZELLE *et al.* 2006; KAWAKAMI 2007), *Tol2* transposon poskytuje výhodu díky vyšší integrační efektivitě, absenci inhibičního efektu při nadprodukcii vlastní transponasy a schopnosti integrovat s vysokým výtěžkem až dvojnásobně velikou transgenní sekvenci (zhruba 11 kbp) oproti transposonu *Sleeping Beauty* (shrnutí v KAWAKAMI 2007). *Tol2* transposon je využíván zejména pro tvorbu *GAL4/UAS* linií u *Danio rerio* (ASAKAWA and KAWAKAMI 2008). Během posledního desetiletí byl tento účinný bipartitní systém pomoci transposibilního elementu *piggyBac* adaptován mj. také u *Bombyx mori* (bourec morušový) (IMAMURA *et al.* 2003) a komára *Anopheles gambiae* (LYND and LYCETT 2012).

Mutagenní podstata transgenních integrací může mít na buňku, potažmo celý organismus, negativní dopad. Náhodné integrace v rámci transposibilních technik vykazují poziční efekt, v jehož důsledku je exprese zasaženého genu snížena, popř. gen není exprimován vůbec – často se tak děje především při integraci do blízkosti heterochromatinových oblastí. Změna rozsahu exprese může být dána také methylací integrované sekvence (shrnutí v HALPERN *et al.* 2008). Přestože se náhodná integrace transgenních sekvencí ukázala být účinným nástrojem pro studium biologických pochodů na mnoha úrovních, pozornost vědecké komunity se upínala také k nástrojům pro integraci transgenních sekvencí do specifických částí genomu. Drtivá většina dnes užívaných technik tzv. genomové editace je založena na jevech indukce zlomů v obou řetězcích DNA, čímž dochází k aktivaci mechanismů buněčné reparační. Ty jsou schopné u určitého zlomku vzorků provést transgenní integraci formou homologní rekombinace, popř. nehomologní ligace konců („non-homologous end joining“ - NHEJ) (viz dále).

Techniky genového inženýrství, založené na homologní rekombinaci, využívají pro transgenní integraci specifické sekvence, které byly do původního genomu integrovány víceméně náhodně - často pomocí transposibilních či mikroinjekčních technik. Spektrum sekvencí, které lze využít pro integraci (či spíše reintegrační substituci), je tedy silně omezené, tato integrace je navíc determinována dostupností přesně definované transgenní linie. Bez ohledu na tyto nedostatky lze tyto homologně-rekombinační techniky využít např. pro konverzi existujících, geneticky definovaných linií mezi různými, navzájem nezávislými systémy. Kýžené linie tedy není nutné získávat integrací transgenních sekvencí *de novo*, odpadají i zdlouhavé a náročné genetické screeny. V kontextu *GAL4/UAS* systému se prvním přístupem stala konverze *LacZ* linií *Drosophila melanogaster* (získaných metodou ET) na *GAL4* linie (SEPP and AULD 1999). Modifikaci *GAL4* linií v rámci stejného nástroje (*GAL80*, *split-GAL4* linie – viz kap. 2.3), popř. možnost přeměny na linie dalších binárních systémů (LexA-*LexAop*, Q-systém – viz kap. 2.5) *in vivo* nabízí nástroj *InSITE*, fungující na principu rekombinační výměny kazet (GOHL *et al.* 2011). *InSITE* zajišťuje sekvenci substituci mezi donorovým plazmidem

a recipientní linií (obsahující *GAL4*) přes rekombinační systémy Flp-*FRT*, Cre-*LoxP* a ΦC31. Zásadní nevýhoda této techniky spočívá v nutnosti generovat pomocí ET nové linie (tzv. IT-*GAL4*) obsahující kromě *GAL4* také specifické sekvence, které jsou rozeznávány jednotlivými rekombinacemi (GOHL *et al.* 2011). Tento nedostatek by bylo možné obejít přeměnou stávajících *GAL4* linií na IT-*GAL4* pomocí nově vyvinutých technik, založených na arteficiálních restriktasách (viz dále). Na podobném rekombinačním principu je založen také v laboratorní praxi poměrně rozšířený *Gateway Cloning* systém, modifikovaný pro tvorbu *GAL4* linií *Drosophila melanogaster* (PFEIFFER *et al.* 2008), který lze využít – podobně jako *InSITE* systém - i pro další konverze, navíc umožňuje integraci transgenních sekvencí z více zdrojů (*Gateway MultiSite* systém) (PETERSEN and STOWERS 2011; SHEARIN *et al.* 2013).

Současné nástroje pro integraci transgenní sekvence do specifické části genomu (tzv. „knock-in“ technologie), založené na homologní rekombinaci a NHEJ, jsou postaveny na konstrukci arteficiálních nukleas (shrnuto v GAJ *et al.* 2013). Techniky „zinc finger nuclease“ (ZFN) (KIM *et al.* 1996; MAEDER *et al.* 2008) a „transcription activator-like effector nuclease“ (TALEN) (CHRISTIAN *et al.* 2010) jsou založeny na proteinových doménách (soubor oligonukleotidů s Cys₂-His₂ motivem zinkového prstu v případě ZFN a DNA-vazebnou doménou proteinu „transcription activator-like effector“ v případě TALEN), striktně rozeznávajících specifickou sekvenci. Tyto DNA-vazebné domény jsou fúzovány s katalytickou doménou restriční endonukleasy *FokI*, štěpící DNA nezávisle na její sekvenci (shrnuto v ESVELT and WANG 2013; GAJ *et al.* 2013). Relativně snadná integrace *GAL4* sekvence pod dosah již charakterizovaných regulačních sekvencí nabízí diametrálně odlišný přístup pro studium funkce genů (např. v porovnání s ET). Pilotní studie pro konstrukci *GAL4* linií *Danio rerio* využívá CRESPE-Ces9 systém, v současnosti nejmodernější nástroj pro cílenou integraci (AUER *et al.* 2014). Tento systém využívá modifikaci vzniklou sgRNA („single guide RNA“) o délce přibližně 20 bp, zajišťující funkčnost celého nástroje (CONG *et al.* 2013). Tento specifický typ RNA lze designovat pro rozeznávání určité sekvence, na kterou se posléze sgRNA váže za vzniku DNA-sgRNA duplexu. Následuje asociace duplexu s Ces9 nukleasou a štěpení v definované pozici - tímto způsobem lze za použití dvou definovaných sgRNA vyštěpit libovolnou sekvenci (CONG *et al.* 2013). Integrace transgenní sekvence lze dosáhnout použitím ssDNA templátu (CHANG *et al.* 2013) i dsDNA, získané z donorového plazmidu (AUER *et al.* 2014). Integrační mechanismus nebyl dosud přesně popsán, kromě homologní rekombinace je ale zřejmě využívána i NHEJ, která však vykazuje náchylnost ke tvorbě bodových mutací, posunu čtecího rámce a tvorbě konkatemerů (shrnuto v AUER and DEL BENE 2014 - v tisku). Veliký potenciál nabízí fúze designovatelných DNA-vazebných domén ZNF a TALEN s aktivními doménami transponas. Spřáhnutí těchto systémů by umožnilo obejít endogenní reparační pochody buňky, které jsou často v nejranějších stádiích embryogeneze nefunkční a na kterých je integrační aktivita ZNF i TALEN závislá (shrnuto v GAJ *et al.* 2013). Propojení genomové editace s technologicky zvládnutými transposibilními systémy (*P-element*, *Tol2*, *PiggyBac*)

by umožnilo relativně snadné generování *GAL4/UAS* linií u organismů, pro které jsou doposud upřednostňovány jiné integrační techniky (MALLO 2006).

2.3. Základní formy regulace / modifikace

Od průkopnických prací, které načrtly základní schéma *GAL4/UAS* expresního systému, aplikovatelného v laboratorní praxi, uplynuly více než dvě desetiletí. Během necelé generace, kdy se tento systém zařadil mezi standardní nástroje genového inženýrství, prošel četnými modifikacemi a úpravami, které ještě více znásobily jeho potenciál (viz obr. 4 na konci kap. 2.3). Prvotní úpravy spočívaly především v mutagenních úpravách základních složek systému – samotného transkripčního faktoru Gal4p, popř. jeho vazebné sekvence, *UAS*, využití našel též specifický represor Gal80p. Jedním z hlavních zájmů byla od počátku snaha o dosažení regulace Gal4p za striktně definovaných podmínek. Metody, založené na jednoduchých fyzikálních podmínkách (teplota, osvětlení), lze relativně dobře aplikovat u raných vývojových stádií, s postupující ontogenezí je však dosažení stejného rozložení hodnot fyzikálních veličin na mikroskopické úrovni stále obtížnější. Striktnější regulace lze dosáhnout za pomoci specifické inducibility. Pozdější zásahy do *GAL4/UAS* systému vedly k jeho spřažení s dalšími binárními systémy, se systémy specifické homologní rekombinace a k odvození nových technik, uplatnitelných i mimo rámec studia genové exprese.

Ačkoliv se transkripční faktor Gal4p ukázal být ve své nativní formě poměrně účinným aktivátorem transkripce v liniích *Drosophila melanogaster* (vysoce korelující s účinností P-elementární transformace) (SPRADLING and RUBIN 1982; FISCHER *et al.* 1988), v tkáních obratlovců příliš vysokou efektivitu nevykazuje¹ (ORNITZ *et al.* 1991; SCHEER and CAMPOS-ORTEGA 1999). Vysoké úrovně aktivace transkripce mj. u *Danio rerio* lze dosáhnout použitím hybridního aktivátoru Gal4p-VP16₄₁₃₋₄₇₀ (vytvořeného fúzí kódujících sekvencí GAL4-DBD s VP16₄₁₃₋₄₇₀, modifikovanou transkripčně-aktivační doménou viru *Herpes simplex*) namísto nativního Gal4p (SADOWSKI *et al.* 1988; BARLEV *et al.* 1995; KÖSTER and FRASER 2001). V důsledku toxického efektu Gal4p-VP16₄₁₃₋₄₇₀ během embryogeneze byly vyvinuty alternativní formy Gal4p, zaručující nízkou toxicitu a současně vysokou indukční aktivitu (shrnuto v OGURA *et al.* 2009). Snížení rizika pozičního efektu představuje „mini-Gal4p“, zkrácená varianta nativního Gal4p. Zatímco původní kvasinkový transkripční faktor sestává z 881 aminokyselin, „mini-Gal4p“ je složen z aminokyselinových zbytků 1-100 a 840-881, tvořících především DNA-vazebnou a aktivační doménu (MA and PTASHNE 1987a), jeho aktivační potenciál však zůstává zachován (WU *et al.* 1996). Potenciál pro hromadnou ektopickou expresi např. v chovných kulturách v určitém stupni vývoje představuje termosensitivní varianta Gal4p^{ts} (MONDAL *et al.* 2007), popř. různě aktivní alely termosensitivního Gal4pINT^{ts}, obsahující inteinovou sekvenci, která zůstává při vyšších teplotách interní součástí proteinové sekvence a blokuje

¹ recentní výsledky naopak hovoří ve prospěch vysoké účinnosti nativní formy Gal4p (FUJIMOTO *et al.* 2011)

funkci Gal4p (ZEIDLER *et al.* 2004). V prostředí s permisivní teplotou dochází k autokatalytickému vyštěpení inteinu (shrnutí v PAULUS 2000) a obnovení funkce Gal4p (ZEIDLER *et al.* 2004). Určitý experimentální prostor poskytují modifikace UAS; na základě konsenzuální UAS sekvence byl vytvořen uměle vytvořený oligomer o délce 17bp (UAS_{17-mer}), vykazující vlastnosti, podobné nativnímu UAS (GINIGER and PTASHNE 1988). Mutagení modifikací UAS_{17-mer} bylo dosaženo mnoha variant s různým vazebným potenciálem (LIANG *et al.* 1996). Na základě studií, provedených v posledních dvaceti letech (LIANG *et al.* 1996; MELCHER and XU 2001) lze uvažovat o racionálním designu sekvence UAS elementů, jejich počtu a vzájemné vzdálenosti za účelem dosažení kyžené regulace na genové úrovni.

Za účelem regulace v určitém stupni vývoje studovaného organismu lze do plazmidového vektoru zaklonovat před některou z variant Gal4p známou regulační sekvenci, která zajišťuje vyšší regulační specifitu. Transkripce Gal4p je pak sice primárně pod kontrolou endogenních regulačních elementů, její spuštění je ale iniciováno vnějším podnětem. Tím lze docílit exprese např. toxického proteinu až ve chvíli, kdy je dosaženo požadovaného stupně ontogenetického vývoje. Relativně snadnou a poměrně účinnou metodou je zakomponování promotoru proteinu tepelného šoku *hsp70* („heat shock protein“) jako řídicího elementu exprese Gal4p. Prostým zvýšením teploty tak lze regulovat aktivitu *GAL4/UAS* systému u *Drosophila melanogaster* (BRAND *et al.* 1994) i *Danio rerio* (SCHEER *et al.* 2001). Nevýhodou tohoto systému je však mj. bazální exprese Gal4p u některých tkání (HALFON *et al.* 1997; ASAKAWA and KAWAKAMI 2008), zvýšená letalita embryí *Drosophila melanogaster* (MALDONADO-CODINA *et al.* 1993) a výrazná časová prodleva mezi podnětem a detekovatelnou expresí reportérového proteinu zejména u raných vývojových stádií *Danio rerio* (ZHAN and GONG 2010). Omezení, vyplývající z tepelného efektu na všechny buňky transgenního organismu, lze obejít cílenými laserovými pulzy, které aktivují *hsp70* jen u vybraných buněk (HALFON *et al.* 1997). Alternativu v případě nutnosti absence bazální transkripce představuje využití chemicky blokováného transkripčního faktoru Gal4p-VP16, který lze aktivovat působením UV záření (CAMBRIDGE *et al.* 1997). Omezením tohoto systému je jednorázové využití transkripčního faktoru, který nelze syntetizovat *in vivo* v blokované formě a nutnost jeho aktivace v raných stádiích embryogeneze (CAMBRIDGE *et al.* 1997).

Silným nástrojem regulované inducibility je sepětí *GAL4/UAS* systému s aktivačním potenciálem hormonů a hormonálních analogů. Princip metody je založen na fúzi genové sekvence Gal4p-DBD se specifickým hormonálním receptorem, schopným aktivovat transkripci jen v přítomnosti specifického ligandu, který se v transgenním organismu přirozeně nevyskytuje. Průkopnickou prací na tomto poli bylo využití ligand-vázající domény estrogenového receptoru (ER) za účelem exprese látek s ablativním potenciálem u *Drosophila melanogaster*. Hybridní transkripční faktor Gal4p-ER aktivuje transkripci pouze při vazbě β -estradiolu, popř. jeho syntetického analogu

diethylstilbestrolu (DES) (HAN *et al.* 2000). Recentní studie naznačují možnost účinné ektopické exprese na základě estrogenového podnětu (systém ERT2-Gal4p) také u *Danio rerio* (GERETY *et al.* 2013). Rychlejší nástup ektopické exprese v porovnání s předchozím systémem vykazuje tzv. *GeneSwitch* systém (OSTERWALDER *et al.* 2001), který využívá pro aktivaci transkripce hybridní faktor pGL-VP, vytvořený fúzí ligand-vázající domény progesteronového receptoru, Gal4p-DBD a aktivační domény VP16 (WANG *et al.* 1994), popř. GLp65, kde aktivační doménu VP16 nahrazuje aktivační doména proteinu p65 (BURCIN *et al.* 1999). Aktivaci *GeneSwitch* systému, využitelného mj. také u *Mus musculus* (BURCIN *et al.* 1999) a *Xenopus tropicalis* (CHAE *et al.* 2002), zajišťuje antiprogestin mifepriston (RU-486) (WANG *et al.* 1994; BURCIN *et al.* 1999). Pro linie *Danio rerio* lze také využít Gv-EcR, sestávající z ligand-vázající domény ekdysonového receptoru (EcR), Gal4p-DBD a aktivační domény VP16 (ESENGIL *et al.* 2007). Jeho aplikace u *Drosophila melanogaster* je ze zřejmých důvodů - přítomnost orthologů ekdysonu – nemožná. Zásadním přínosem tohoto typu nástroje je, že i přes aktivní transkripci daného typu Gal4p vykazuje tento transkripční faktor při absenci specifického ligandu (nejčastěji podávaného formou potravy) téměř nulový aktivační potenciál, díky čemuž se tyto indukibilní systémy staly vhodným nástrojem pro časově regulovanou, ektopickou expresi např. toxických látek (HAN *et al.* 2000; OSTERWALDER *et al.* 2001; ESENGIL *et al.* 2007; GERETY *et al.* 2013).

Mašinerii ektopické exprese lze indukovat také pomocí tetracyklinového (Tet) transaktivačního systému, odvozeného od bakteriálního (*Escherichia coli*) tet-regulonů, zajišťujícího rezistenci vůči antibiotiku tetracyklinu a jeho analogům (zejména doxycyklinu). Nativní systém tetracyklinové rezistence je založen na expresi membránového antiporteru TetA (zajišťujícího export tetracyklinu, vázaného do komplexu s dvojmocným kovem) a regulačního faktoru TetR. TetR je esenciálním faktorem negativní zpětné vazby celého systému - v nepřítomnosti tetracyklinu je vázán ve formě homodimeru ke dvěma protilehlým tet-operonovým sekvencím, čímž brání aktivaci transkripce genů pro TetA a TetR. Přítomnost homodimerního tetracyklinu v komplexu s dvojmocným kovem vede v důsledku asociace TetR k tomuto komplexu k jeho vyvázání z regulačních sekvencí a ke spuštění transkripce. Důsledná regulace tohoto rezistenčního systému je důležitá mj. kvůli toxickému potenciálu TetA (shrnuto ve WELMAN *et al.* 2007). Původní Tet-systém (tzv. *Tet-Off* systém) využívá pro aktivaci transkripce hybridní konstrukt (tTA - tet-responsive trans-activator), vzniklý fúzí TetR s aktivační doménou proteinu VP16. tTA je za standardních podmínek (nepřítomnost ligandu) vázán k příslušnému tet-operonu, v důsledku přítomné aktivační domény VP16 dochází k indukci transkripce genu pod kontrolou daného operonu; samotný tTA může být exprimován dle tkáňově specifického, endogenního promotoru. Ektopickou expresi lze potlačit podáním tetracyklinu např. v potravě (GOSSEN and BUJARD 1992). Mutagenézí vygenerovaný *Tet-On* systém funguje na opačném principu – k vazbě hybridního aktivačního faktoru (rtTA - reverse tet-responsive trans-activator) do tet-operonu a následné aktivaci transkripce dochází pouze v přítomnosti indukčního ligandu doxycyklinu (GOSSEN

et al. 1995). Pro účely propojení *Tet-On* systému s *GAL4/UAS* systémem u *Drosophila melanogaster* byla využita modifikovaná verze (tzv. 2. generace) *Tet-On* systému (rtTA^S-M2-alt), kterou lze oproti původní verzi aktivovat nižšími dávkami ligandu a která vykazuje vyšší indukční aktivitu a značně redukovanou bazální expresi transgenní sekvence (URLINGER *et al.* 2000; STEBBINS *et al.* 2001; FORD *et al.* 2007). Tripartitní nástroj byl sestaven s ohledem na existující, nezávislé transgenní linie s inkorporovaným tet-operonem a *GAL4* kódující sekvencí. Přemostěním mezi oběma systémy je kódující sekvence rtTA^S-M2-alt, kontrolovaná UAS regulačním elementem (STEBBINS *et al.* 2001). Na stejném principu byla založena také adaptace Tet-Off systému (STEBBINS and YIN 2001), kvůli své náročnější technické manipulaci je však mezi vědeckou komunitou méně oblíbený, konstantní vystavení studovaného organismu antibiotiku je navíc pro studované organismy rizikové zejména v průběhu embryogeneze (GOSSEN *et al.* 1995). V porovnání s hormonálně-inducibilním systémem *GeneSwitch* vykazuje rtTA^S-M2-alt nástroj vyšší míru exprese, navíc ho lze aplikovat na širší spektrum tkání (FORD *et al.* 2007). Současný výzkum na poli Tet-systému nabízí 3. generaci tohoto indukibilního nástroje, tzv. *Tet-On 3G* systém, který v porovnání s předchozími variantami nabízí silnější aktivační potenciál, absenci bazální transkripce a vyžaduje řádově nižší koncentraci doxycyklinu, potřebnou pro indukci exprese (ZHOU *et al.* 2006). Pro účely *GAL4/UAS* systému však nebyla tato varianta doposud využita.

Uplatnění v regulaci *GAL4/UAS* systému našly také rekombinační systémy, rozeznávající specifické sekvence. Rozšířenými nástroji pro genové manipulace se staly zejména dva z nich, Flp-*FRT* a Cre-*LoxP* systém, které narozdíl od dalších systémů podobného typu nevyžadují pro svou aktivitu téměř žádné specifické faktory – lze je proto adaptovat pro široké spektrum eukaryotních druhů (shrnutí v SAUER 1994). Za účelem manipulace s genomem *Drosophila melanogaster* vytvořený Flp-*FRT* rekombinační systém byl odvozen od 2 μm minichromozomu *Saccharomyces cerevisiae* (GOLIC and LINDQUIST 1989; STRUHL and BASLER 1993). Jeho podstatou je Flp rekombinasa (flippasa), která rozeznává dvě semipalindromatické *FRT* (flippase recognition target) sekvence o délce 34 bp a katalyzuje mezi nimi vzájemnou rekombinaci. Produkt rekombinačního aktu je determinován vzájemnou orientací cis-*FRT* elementů – jsou-li orientovány ve stejném směru, dojde k excizi „vmezežené“ sekvence, pokud jsou vůči sobě v opačné orientaci, je zmíněná sekvence invertována. Reciproké rekombinace lze docílit u lineárních molekul DNA za pomoci trans-*FRT* elementů, orientovaných ve stejném směru. Zatímco Flp-*FRT* cis-rekombinaci lze indukovat takřka kdykoliv, úspěšné rekombinace trans-formy lze dosáhnout zpravidla jen u dělících se buněk (shrnutí v SAUER 1994). Pro účely načasované indukce *GAL4/UAS* systému se využívají tzv. *Flip-out* vyštěpitelné kazety, sekvence ohraničené stejnsměrnými *FRT* elementy, které obsahují regulační element (např. určitý typ terminátoru), účinně blokující transkripci funkčního produktu (NELLEN *et al.* 1996; ITO *et al.* 1997). Integrací takovéto *Flip-out* kazety mezi endogenní / transgenní regulační element a *GAL4* (ITO *et al.* 1997), popř. mezi *UAS* a gen regulovaný *UAS* elementem (NELLEN *et al.*

1996) je aktivita *GAL4/UAS* kaskády blokována do doby, než je vnějším podnětem indukována exprese flippasy. Podobně jako exprese Gal4p může být i flippasa exprimována tepelnými šoky díky přítomnosti *hsp70* promotoru (GOLIC and LINDQUIST 1989; STRUHL and BASLER 1993; NELLEN *et al.* 1996; ITO *et al.* 1997). Cre-*LoxP* rekombinační systém, poprvé identifikovaný u bakteriofága P1 (STERNBERG 1981), je v hlavních rysech podobný Flp-*FRT* systému. Výsledky rekombinace dle vzájemné topologie *LoxP* elementů pomocí Cre rekombinasy jsou totožné s výsledky u Flp-*FRT* systému, stejnou délku vykazují u obou systémů také sekvence, rozeznávané specifickou rekombinací (shrnuje SAUER 1994). Cre-*LoxP* rekombinační systém byl v propojení s *GAL4/UAS* nástrojem aplikován u *Drosophila melanogaster* teprve nedávno (TANIGUCHI *et al.* 2011); narušil od Flp-*FRT* systému dovoluje účinně regulovat ektopickou expresi i během rané embryogeneze (THEODOSIOU and XU 1998; NAKAZAWA *et al.* 2012). Nevýhodou je určitá hladina bazální exprese v některých tkáních a zejména nemožnost aplikovat tento systém u nervové a svalové tkáně (NAKAZAWA *et al.* 2012). Nedávné zavedení Cre-*LoxP* pro *GAL4/UAS* linie *Danio rerio* (COLLINS *et al.* 2010; XIONG *et al.* 2013) umožnilo rozšířit možnosti regulace ektopické exprese *GAL4/UAS* systémem také pro studium obratlovců.

Správné načasování ektopické exprese je klíčovým faktorem studia pokročilých stádií ontogenetického vývoje, neméně důležité je však také omezení této exprese na úzký okruh specifických buněk. Toho lze docílit integrací řídicích složek *GAL4/UAS* systému pod více endogenních regulačních elementů – k ektopické expresi dojde jen ve tkáních, kde jsou tyto elementy aktivní. Zatímco většina přístupů, popsaných v předešlém textu, je postavena na pozitivní regulaci exprese transkripčního faktoru Gal4p (s výjimkou *Tet-Off* systému), výzkum efektivní negativní regulace byl – zejména kvůli technické náročnosti chovu takto modifikovaných transgenních organismů – v pozadí. Zakomponováním nového řídicího elementu *GAL4/UAS* systému, nativního represoru kvasinkového metabolismu galaktosy (LEE and LUO 1999), byl doplněn poslední střípek mozaiky, ustanovující základ komplexnějších technik genového mozaicismu (viz dále). Represor Gal80p nevykazuje v organismu *Drosophila melanogaster* negativní účinky; lze ho integrovat technikou ET (SUSTER *et al.* 2004), využívány jsou mj. také konverzní přístupy (PFEIFFER *et al.* 2008; GOHL *et al.* 2011). Zavedením tohoto represoru je dosaženo vysoké míry tkáňové specifity, kterou lze navíc regulovat i v časovém kontextu využitím např. termosensitivních mutantů Gal80p^{ts} (MCGUIRE *et al.* 2003), popř. Gal80pINT^{ts} (ZEIDLER *et al.* 2004). Pro účinné potlačení aktivity transkripčního faktoru Gal4p je nutná exprese Gal80p v ekvimolárním poměru ku Gal4p (FAUCHERRE and LÓPEZ-SCHIER 2011), které lze dosáhnout volbou vhodného promotoru (LEE and LUO 1999), použitím modifikované formy Gal80p, popř. vícekopiovou inzercí tohoto represoru (PFEIFFER *et al.* 2010). Zájem o původní formu Gal4p vzrůstá také v řadách obratlovčích neurobiologů – nativní Gal4p se pomocí ET (narušil od Gal4p-VP16₄₁₃₋₄₇₀) ochotně integruje do blízkosti regulačních elementů úzce specializovaných nervových tkání *Danio rerio* (FUJIMOTO *et al.* 2011). I zde je represor Gal80p

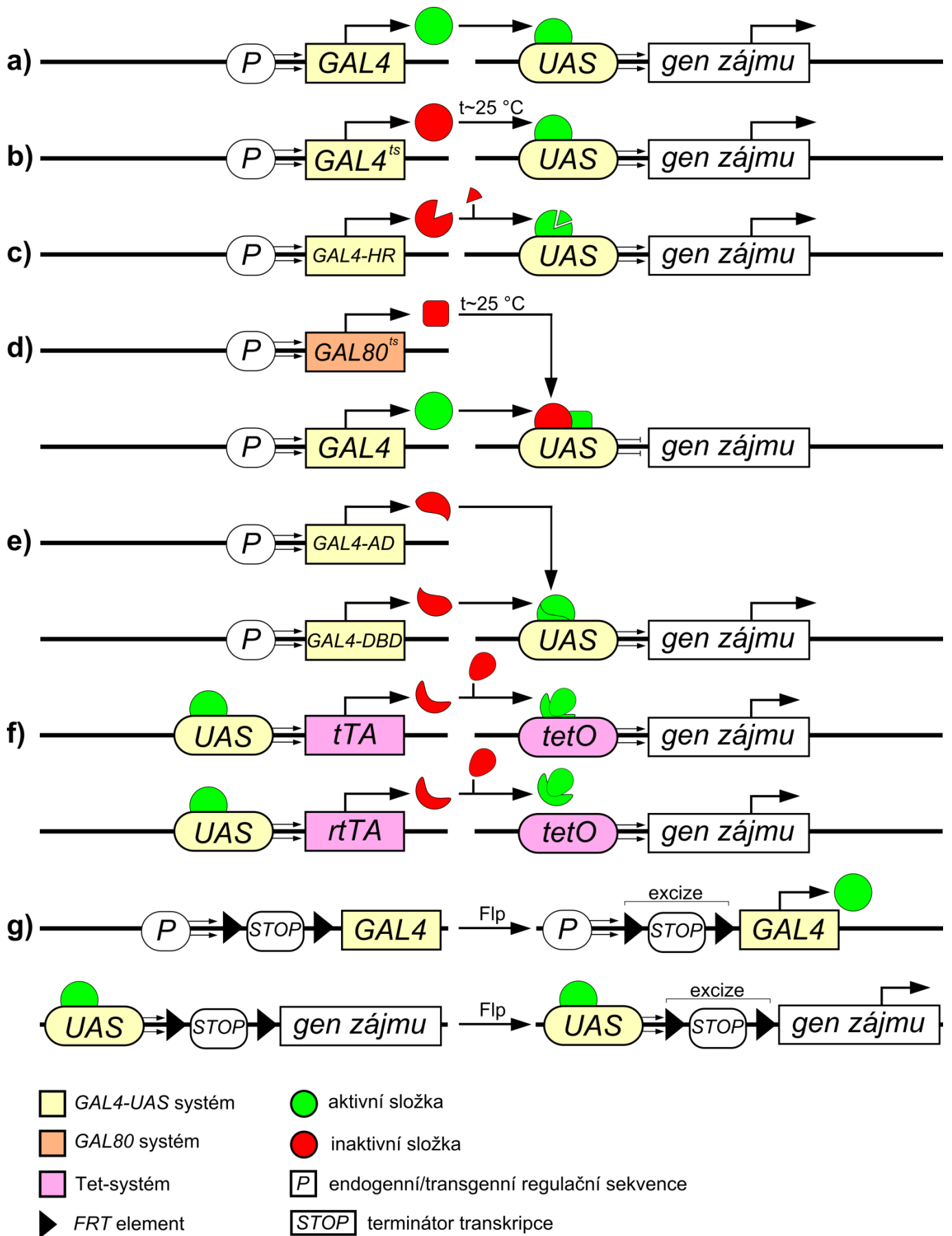
účinným regulátorem Gal4p (FUJIMOTO *et al.* 2011; FAUCHERRE and LÓPEZ-SCHIER 2011), není však schopen potlačit funkci Gal4p-VP16₄₁₃₋₄₇₀ (FAUCHERRE and LÓPEZ-SCHIER 2011). Tyto linie lze regulovat na genové úrovni pomocí morpholina (GAL4MO), protismyslné mRNA potlačující expresi Gal4p-VP16₄₁₃₋₄₇₀ (FAUCHERRE and LÓPEZ-SCHIER 2011).

Alternativou k využití represoru Gal80p je technologie *split-GAL4*, postavená na zkušenostech s využitím separace domén *GAL4* u *Saccharomyces cerevisiae* pro studium proteinových interakcí (dvouhybridní systém – *Y2H* – ad.) (FIELDS and SONG 1989). Princip *Y2H* vychází z neschopnosti Gal4p-AD aktivovat transkripci z *UAS* elementu bez přítomnosti Gal4p-DBD (KEEGAN *et al.* 1986). Domény Gal4p jsou nezávisle na sobě fúzovány s proteiny, schopnými vzájemné vazby - v ideálním případě dojde touto vazbou k přiblížení obou domén a obnovení aktivity transkripčního faktoru Gal4p, který spouští ektopickou expresi reportérového proteinu, potvrzujícího úspěšnou proteinovou interakci (FIELDS and SONG 1989). Narozdí od *Y2H* jsou „interakčním“ prvkem *split-GAL4* systému odlišné regulační elementy, separátně kontrolující expresi jednotlivých domén (LUAN *et al.* 2006). Gal4p-DBD a Gal4p-AD jsou fúzovány s krátkými sekvencemi, které jsou při vzájemné interakci (motivem leucinového zipu) zodpovědné za tvorbu heterodimeru Gal4p a obnovení jeho funkce. Tento mechanismus je podmíněn aktivitou obou regulačních elementů v dané buňce – tím lze zajistit ektopickou expresi i u vysoce specializovaných tkání *Drosophila melanogaster* (LUAN *et al.* 2006). Doménu Gal4p-AD lze v případě potřeby nahradit doménou VP16₄₁₃₋₄₇₀ (LUAN *et al.* 2006), popř. aktivační doménou proteinu p65, která vykazuje vyšší úspěšnost ektopické exprese (LUAN *et al.* 2006; PFEIFFER *et al.* 2010).

2.4. Komplexní techniky genového mozaicismu

Genový mozaicismus je postaven na tvorbě genotypicky jednotných buněčných linií, jejichž genová informace se v kontextu genomu zbylých buněk organismu liší. Technika mozaicismu umožňuje omezit fenotypový projev mutací, jež jsou zájmem studia, na úzký okruh buněk – organismus je tedy viabilní i v případě, že studované mutace jsou letálního charakteru. Využití našlo generování mozaicismu především na poli vývojové biologie, kde je s jeho pomocí možné studovat osud jednotlivých buněčných linií, jejich migraci a diferenciaci. V současnosti se tato technika mj. využívá - díky její specifikaci na extrémně úzký okruh tkání - pro neurologické studie na morfologické i behaviorální úrovni (viz kap. 3.3).

Jev mozaicismu vychází z autonomních reparačních pochodů buňky; tvorbou zlomu na obou řetězcích DNA dochází k indukci homologní rekombinace a k výměně částí sesterských chromatid mezi homologními chromozomy (GRIFFIN *et al.* 2014). Při segregaci chromatid v rámci anafáze pak u přibližně poloviny buněk (PIMPINELLI and RIPOLL 1986) dochází k ustavení homozygotnosti všech



Obr. 4 – základní modifikace GAL4/UAS expresního systému; **a)** klasická podoba **b)** termosensitivní GAL4 varianta **c)** regulace termosensitivním GAL80 **d)** hormonální regulace **e)** split-GAL4 systém **f)** Tet-On a Tet-Off systém **g)** Flp-FRT rekombinační systém. Adaptováno podle ELLIOTT and BRAND 2008 a dalších (viz text).

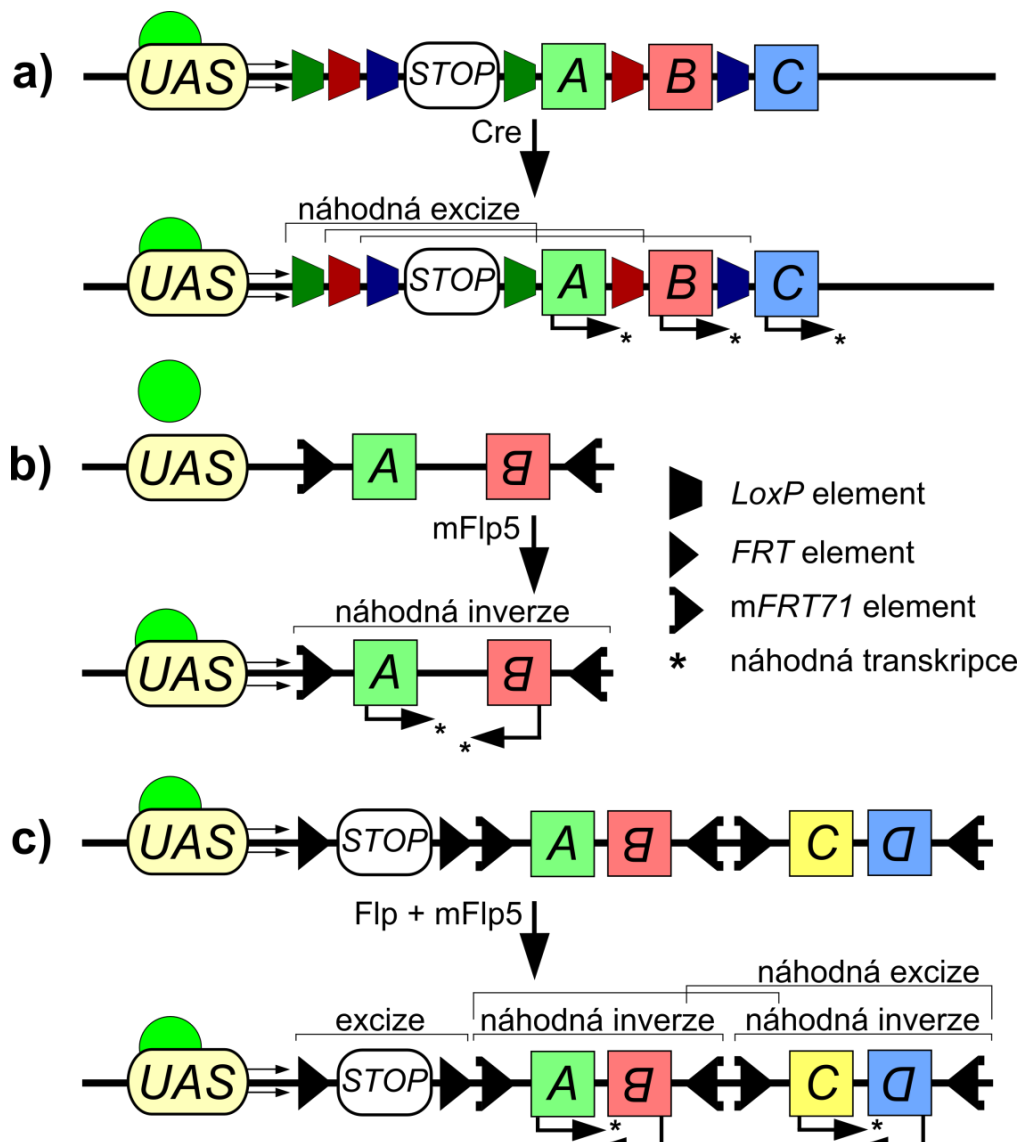
genů, které na chromozomu leží směrem od místa zlomu ke konci chromozomálního ramene. Pokud se studovaný gen nachází v oblasti rekombinace a je-li v rámci buňky v heterozygotní konstituci, potom se v obou dceřiných buňkách stává daný gen homozygotním (v každé ze dvou dceřinných buněk pro odlišnou alelu). Počet genotypově odlišných buněk lze regulovat indukci mitotické rekombinace v určitém vývojovém stádiu (shrnuto v LEE 2014 a GRIFFIN *et al.* 2014). Relativně dlouhou dobu bylo pro tvorbu zlomů u *Drosophila melanogaster* využíváno ionizující ozařování (PATTERSON 1929; BRYANT and SCHNEIDERMAN 1969), průlom v generování mozaicismu nastal až s nástupem pokročilých integračních technik. Transposibilní inserce trans-*FRT* elementů umožňuje aktivovat homologní rekombinaci flipassou, jejíž expresi lze iniciovat vnějším podnětem (GOLIC and LINDQUIST 1989; LEE and LUO 1999). Protknutím technik tvorby mozaicismu s regulačními možnostmi *GAL4/UAS* systému lze vytvářet mozaicismus pro množství buněk, pohybující se v řádu desítek až jednotek. Úspěšně rekombinované buňky lze detekovat pomocí exprese specifických markerů, nejčastěji fluorescenčních proteinů (viz další text a obr. 5 a 6).

První prací na poli *GAL4/UAS* genového mozaicismu se stala technika „mosaic analysis with a repressible cell marker“ (*MARCM*), vůbec první mozaiková technika, umožňující pozitivní značení buněk s homozygotní konstitucí genu zájmu (LEE and LUO 1999). Základem klasických *FLP-FRT* rekombinačních technik mozaicismu je integrace genu zájmu a reportérového genu v trans-postavení do rekombinovatelných homologních chromozomů (GOLIC and LINDQUIST 1989). Reportérový protein (marker) je následně exprimován ve všech buňkách s aktivním regulačním elementem, kontrolujícím expresi daného markeru. Současně dochází k expresi genu zájmu, který je ve většině případů recesivního charakteru a nemá tedy díky heterozygotní konstituci fenotypový projev. Při iniciaci rekombinace se gen zájmu dostává v části buněk do homozygotního postavení a lze pozorovat jeho vliv na fenotyp, současně ale dochází ke ztrátě reportérového genu – ten je tedy exprimován pouze „na pozadí“ (GOLIC and LINDQUIST 1989; XU and RUBIN 1993). Inovativní přístup *MARCM* spočívá v integraci genu pro reportérový protein (regulovaného *UAS* elementem) a mutace zájmu do stejného ramene určitého chromozomu (cis-postavení). Do homologního chromozomu je potom vnesena sekvence genu *GAL80*; transkripční faktor Gal4p a flippasa jsou integrovány mimo oblast rekombinace. Exprese reportérového proteinu je účinně blokována represorem Gal80p (LEE and LUO 1999). Po iniciaci *Flp-FRT* rekombinace se část dceřinných buněk stává homozygotními pro mutaci zájmu i reportérový gen, současně u nich dochází k eliminaci genu pro represor Gal80p. Výsledkem je vizualizace buněk, homozygotních pro mutaci zájmu (LEE and LUO 1999). Alternativou, která narozdíl od *MARCM* neindukuje konverzi heterozygotní konstituce genu zájmu v homozygotní, je technika „ET-Flp-induced intersectional *GAL80/GAL4* repression“ (*FINGR*) (BOHM *et al.* 2010). Tato metoda využívá pro dosažení ektopické exprese dle tkáňové specifity techniku ET, pomocí které je gen flippasy integrován pod dosah endogenních regulačních elementů. V separátních liniích dochází k inkorporaci sekvencí, umožňujících pozitivní, popř. negativní regulaci represorem Gal80p (GORDON

and SCOTT 2009; BOHM *et al.* 2010). Tyto sekvence obsahují kromě určitého univerzálního promotoru - aktivního ve většině tkání, např. *tubP* (O'DONNELL *et al.* 1994) – také *Flip-out* kazetu (negativní regulace; terminační sekvence ohraničená *FRT* elementy), popř. *Flip-in* kazetu (pozitivní regulace; gen *GAL80*, ohraničený *FRT* elementy). Následuje sekvence *GAL80* (negativní regulace), resp. terminační sekvence (pozitivní regulace) (GORDON and SCOTT 2009). Po prokřížení s *ET-Flp*, *GALA* a *UAS* liniemi lze nezávisle na sobě „inverzně“ vizualizovat aktivitu tkáňově specifických promotorů (BOHM *et al.* 2010).

MARCM prošel od svého vzniku četnými modifikacemi, rozšiřujícími možnosti klonální analýzy. Pomocí tzv. „twin-spot *MARCM*“ (*TS-MARCM*) (YU *et al.* 2009), lze pozitivně značit každou buňku, vycházející z indukované mitotické rekombinace jako homozygot pro jednu z alel genu zájmu. Stejně jako u *MARCM*, i u této metody se předpokládá výskyt mutace zájmu v heterozygotní konstituci, narozdíl od původní metodiky však dochází po iniciaci rekombinace v obou dceřinných buňkách k expresi odlišného reportérového genu. Tyto dceřinné buňky jsou základem buněčných linií, exprimujících jeden z těchto dvou proteinů - výsledkem je vizualizace genotypicky odlišných buněk ve dvoubarevném provedení (YU *et al.* 2009). Princip *TS-MARCM* je založen na RNA interferenci (FIRE *et al.* 1998), řízené *UAS* elementem (DIETZL *et al.* 2007). Na chromozomálním rameni je za *FRT* elementem umístěn gen reportérového proteinu A; na stejném rameni se současně nachází sekvence pro expresi miRNA, interferující s genem pro reportérový protein B. Homologní chromozom má distálně za *FRT* sekvencí integrován naopak gen reportérového proteinu B a sekvenci pro miRNA, interferující s genem reportérového proteinu A. Každá z těchto čtyř transgenních sekvencí je regulována samostatným *UAS* elementem, transkripční faktor Gal4p je exprimován mimo oblast rekombinace. Za normálních podmínek brání transkripci obou reportérových proteinů příslušná miRNA, nasedající na transkribovanou oblast (DIETZL *et al.* 2007; YU *et al.* 2009), po rekombinačním aktu se však část buněk dostává pro oblast rekombinace do homozygotní konstituce a oba reportérové proteiny jsou v sesterských buňkách odděleně exprimovány (YU *et al.* 2009). Metodika „twin-spot generator“ (*TSG*) je také postavena na expresi dvou reportérových genů (GRIFFIN *et al.* 2009). Jejich projev na úrovni fenotypu je blokován povahou hybridních sekvencí *RG* a *GR*, nalézajících se v transpozici na ramenou homologních chromozomů. *RG* a *GR* elementy kódují N-terminální sekvenci reportérového proteinu A (resp. B) a C-terminální sekvenci reportérového proteinu B (resp. A) (GRIFFIN *et al.* 2009); obě terminální části jsou odděleny *FRT* elementem, inkorporovaném v intronu. Po mitotické rekombinaci dochází k obnově kódujících sekvencí a reportérové geny jsou pomocí Gal4p exprimovány. Každá z dceřinných buněk má dispozici pro expresi odlišného reportérového proteinu, narozdíl od *TS-MARCM* může být ale mitotická rekombinace podnícena i mimo buněčné dělení, což má za následek expresi obou reportérových proteinů v rámci jedné buňky (GRIFFIN *et al.* 2009; YU *et al.* 2009). Třetí alternativu k předchozím technikám představuje systém „Gal4p technique for real-time and clonal expression“ (*G-TRACE*), umožňující detekovat buňky, v jejichž linii proběhla

mitotická rekombinace a zároveň v reálném čase zobrazit aktivitu tkáňově specifických regulačních elementů (EVANS *et al.* 2009). Podstatou je integrace několika složek do genomu *Drosophila melanogaster* – genu reportérového proteinu A a flippasy, jejichž exprese je determinována aktivitou nezávislých UAS elementů. Pod kontrolou regulačního elementu, aktivního v širokém spektru tkání se nachází poslední komponenta - transgenní sekvence, sestávající z terminační sekvence (ohraničené FRT elementy) a genu pro reportérový protein B. Po prokřížení s jedincem ze zavedených GAL4 linií dochází v určité fázi ontogenetického vývoje k expresi Gal4p, následkem je exprese reportéru A a zprostředkovaně též vyštěpení Flip-out kazety – tím je v dané buňce (a od ní odvozené buněčné linii) aktivována konstitutivní exprese reportéru B (marker úspěšné rekombinace). Reportérový protein A je exprimován pouze ve chvílích, kdy je endogenní regulační element, napojený na GAL4/UAS kaskádu, aktivní (EVANS *et al.* 2009). Technika G-TRACE – podobně jako FINGR – nevede ke tvorbě homozygotů v modifikovaném genotypu (EVANS *et al.* 2009; BOHM *et al.* 2010).



Obr. 5 – techniky stochastické exprese reportérových proteinů; a) *dBrainbow* b) *Flybow 1.0* c) *Flybow 2.0*. Adaptováno podle HADJIECONOMOU *et al.* 2011 a HAMPEL *et al.* 2011.

Expresi jednoho typu reportérového proteinu – stochastickým výběrem ze široké palety fluorescenčních barviv - v buňkách *Drosophila melanogaster* umožňuje technologie „*Drosophila Brainbow*“ (*dBrainbow*) (HAMPEL *et al.* 2011), odvozená od *Brainbow* techniky typu 1.0, zavedené u *Mus musculus* (LIVET *et al.* 2007). Stejně jako původní systém využívá *dBrainbow* transgenní sekvenci, složenou z genů pro jednotlivé typy fluorescenčních proteinů (LIVET *et al.* 2007; HAMPEL *et al.* 2011), obohacenou o transkripčně-terminační element (HAMPEL *et al.* 2011). Každá z těchto „kazet“ je obklopena párem unikátních, navzájem nekompatibilních párů *LoxP* elementů (LEE and SAITO 1998), které jsou spolu s markerovými kazetami navrženy tak, aby po excizi Cre rekombinací byl exprimován pouze jeden z fluorescenčních proteinů (LIVET *et al.* 2007; HAMPEL *et al.* 2011). Specifikem *dBrainbow* je možnost dvojnásobné integrace této transgenní sekvence do genomu studovaného organismu, navíc pod kontrolou *UAS* elementů. Tím je dosaženo vyšších rozlišovacích schopností, větší barevné variability rekombinovaných buněčných linií, které jsou po disekci zobrazovány pomocí specifických protilátek; pozorování *in vivo* využívá jedné integrace transgenní sekvence (HAMPEL *et al.* 2011). Negativem techniky *dBrainbow* je toxicita Cre rekombinasy pro *Drosophila melanogaster* (HEIDMANN and LEHNER 2001; HAMPEL *et al.* 2011) a bazální exprese pod kontrolou *hsp70* promotoru i mimo podmínky indukce (SIEGAL and HARTL 1996). Nahrazením klasické Cre rekombinasy variantou s oddělenými doménami (*split-Cre*) – pod kontrolou *UAS* elementů - lze v rámci *dBrainbow* dosáhnout vyšší rekombinační efektivity a především striktnější regulace ektopické exprese (BOULINA *et al.* 2013). Funkci *split-Cre* rekombinasy je možné obnovit krátkým světelným pulzem specifické vlnové délky, který iniciuje tvorbu heterodimeru (KENNEDY *et al.* 2010). Adaptace Flp-*FRT* rekombinačního systému na „nosné lešení“ techniky *Brainbow 2.0* (LIVET *et al.* 2007) umožňuje opakovaně indukovat mitotickou rekombinaci u již jednou rekombinované, značené linie. Tato technika, nazvaná *Flybow (FB)* (HADJIECONOMOU *et al.* 2011), využívá v rámci svých tří subtypů (*FB 1.0*, *FB 1.1* a *FB 2.0*) kromě nativní varianty Flp-*FRT* (pouze *FB 2.0*) především modifikovanou formu mFlp5/m*FRT71* (VOZIYANOV *et al.* 2003), nevykazující s původním systémem žádné známky interference (HADJIECONOMOU *et al.* 2011). Principiálně vychází *FB* kromě rekombinační excize také z inverze transgenních kazet, obsahujících fluorescenční proteiny. Tím lze dosáhnout u sledované linie buněk (např. neuronů) barevné metamorfózy v průběhu ontogeneze. *FB 1.0* obsahuje v transgenní kazetě dva odlišné fluorescenční proteiny, mezi kterými je v rámci inverze stochasticky volena varianta, která bude exprimována. *FB 1.1* je složena ze dvou kazet, z nichž opět každá obsahuje dva fluorescenční proteiny; u tohoto subtypu může během rekombinace dojít k inverzi jedné z kazet, popř. obou kazet jako celku, podobným způsobem může dojít také k vyštěpení. Tím dochází k náhodné volbě mezi čtyřmi přítomnými, odlišnými reportérovými proteiny. *FB 2.0* je v zásadě podobná *FB 1.1*, obsahuje však navíc terminační kazetu, která brání vizualizaci nerekombinované buňky (HADJIECONOMOU *et al.* 2011). Role Gal4p spočívá kromě koindukce reportérových proteinů v tkáňovém určení okruhu ektopické exprese; hybnou silou

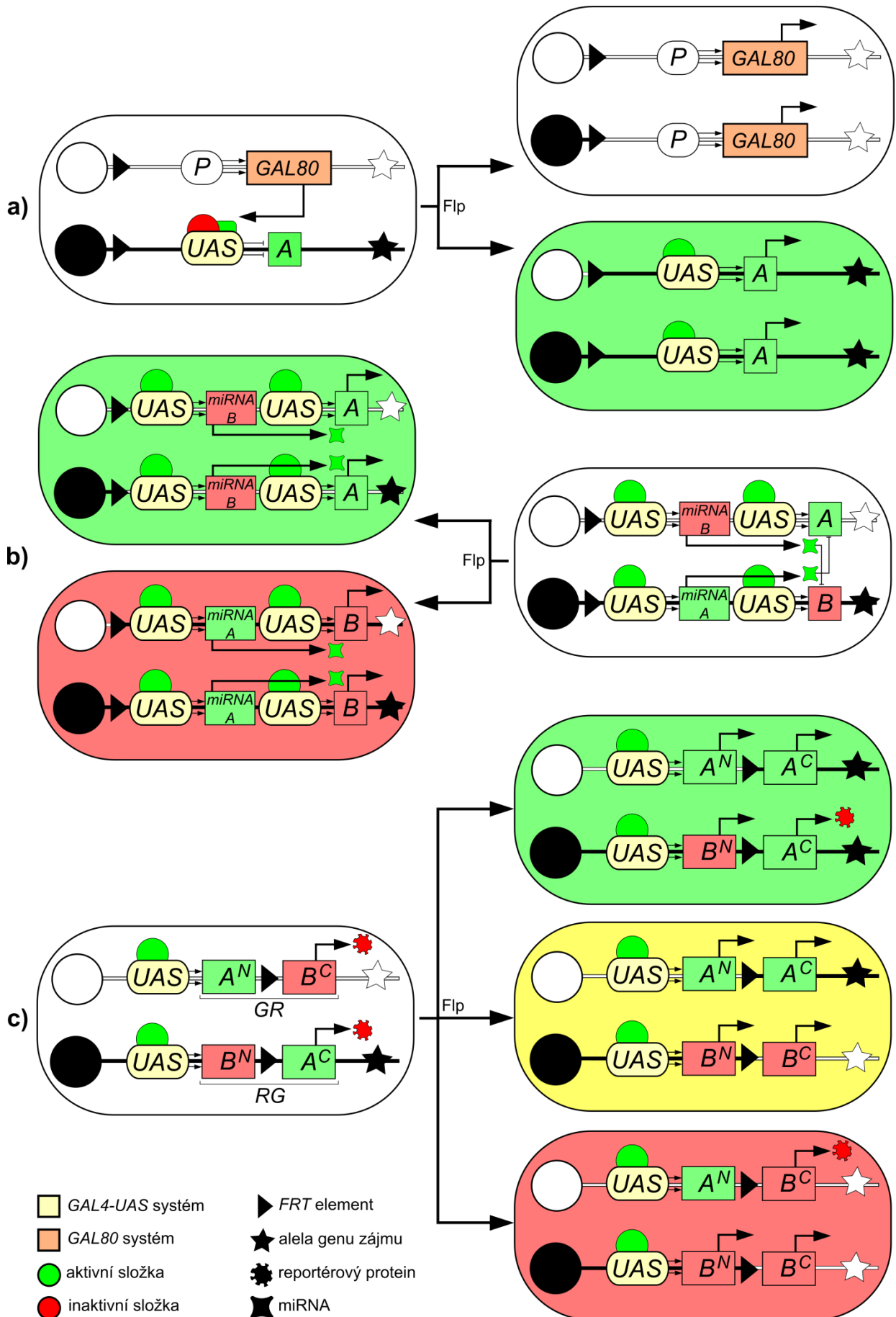
je však vnější aktivace exprese daného typu flippasy přes promotor *hsp70* (GOLIC and LINDQUIST 1989; HADJIECONOMOU *et al.* 2011).

Techniky pro tvorbu genového mozaicismu pomocí GAL4/UAS systému se dlouhou dobu zaměřovaly primárně na zástupce členovců, octomilku *Drosophila melanogaster*, ta však v určitých oblastech (např. neurofyziologie) není dostačujícím modelovým organismem. Poslední léta přinesla vzrůstající zájem o aplikaci těchto nástrojů i pro potřeby výzkumu obratlovců; současná pozornost vědecké komunity cílí především na *Danio rerio*, paprskoploutvou rybu, jejíž larvální stádium je díky své transparentnosti ideálním objektem pro studium mozaicismu *in vivo*. Metoda „mosaic analysis in zebrafish“ (MAZe) (COLLINS *et al.* 2010) je vystavěna na komplexní sekvenci, zahrnující v cis-konstituci specifický promotor, jím řízený gen pro transkripční faktor Gal4p-VP16, UAS element a reportérový protein. Aktivaci transkripce Gal4p-VP16₄₁₃₋₄₇₀ brání vmezeřená *Flip-out* kazeta v opačné orientaci, která je ohraničena *loxP* elementy a obsahuje promotor *hsp70* a gen pro Cre rekombinasi. V případě indukce vzniká autoregulační smyčka, ústící k excizi *Flip-out* kazety a ke spuštění GAL4/UAS kaskády, vedoucí k vizualizaci rekombinované buňky. Pro ovlivnění organismu na buněčné úrovni je možné využít i existující UAS linie, kterou jsou po excizi aktivovány *in trans* (COLLINS *et al.* 2010).

Jelikož je míra úspěšné rekombinace i při permisivní teplotě variabilní (HALLORAN *et al.* 2000), lze míru mozaicismu regulovat délkou tepelného pulzu (COLLINS *et al.* 2010). Užitečným nástrojem na poli neurologické konektomiky se stala technika *Zebrabow*, umožňující – podobně jako *Brainbow* – důmyslným spřažením GAL4/UAS a Cre-LoxP systémů odlišnou vizualizaci jednotlivých buněčných linií (PAN *et al.* 2013). Přestože bylo v průběhu posledních několika let pro *Danio rerio* zkonstruováno hned několik cenných technik genového mozaicismu, stále chybí přístupy, využívající pro tvorbu parciálních homozygotů interchromozomální rekombinaci pod taktovkou GAL4/UAS binárního systému.

2.5. Propojení s odlišnými bipartitními systémy

Koncept ektopické exprese segregací řídicích elementů na dvě doplňující se složky využívají kromě GAL4/UAS systému i další bipartitní techniky, např. LexA-LexAop systém (LAI and LEE 2006), Q-systém (POTTER *et al.* 2010) a v určitém smyslu také Cre-LoxP, Flp-FRT a další rekombinační systémy (shrnuto v SAUER 1994 a DEL VALLE RODRÍGUEZ *et al.* 2011). Aplikaci bipartitního řízení exprese lze kromě experimentálně-laboratorních „korekcí“ modelovat také teoreticky *in silico* pomocí matematických přístupů (NACHER and AKUTSU 2013). Bipartitní systémy (včetně GAL4/UAS) jsou využitelné i na poli syntetické biologie jako biologická varianta elementárních matematických



obr. 6 - základní techniky genového mozaicismu v kombinaci s GAL4/UAS systémem; **a)** MARCM **b)** TS-MARCM **c)** TSG. Adaptováno podle LEE and LUO 1999, GRIFFIN *et al.* 2009 a YU *et al.* 2009.

operátorů v rámci konstrukce umělého metabolického okruhu (POTTER *et al.* 2010; shrnuto v AUSLÄNDER and FUSSENEGGER 2013). Regulační specifita *GAL4/UAS* systému byla ještě více prohloubena jeho propojením – nezávisle na sobě – se dvěma binárními nástroji, *LexA-LexAop* a *Q*-systémem, které fungují taktéž na principu aktivace transkripčním faktorem, vázaným na specifickou sekvenci DNA (viz dále).

Studium biologických pochodů na molekulární úrovni a jejich pochopení vedlo k mezidruhovému transferu základních komponent řízení genové exprese a k jejich invenčnímu využití pro hlubší pohled na biologické děje. *LexA-LexAop* systém je ve své původní podobě represibilní složkou tzv. SOS odpovědi *Escherichia coli* (BRENT and PTASHNE 1981), vedoucí k reparaci poškozené DNA (shrnuté v JANION 2008). Transkripční represor LexA se váže ke specifické regulační sekvenci – LexA operátoru (*LexAop*) - a blokuje transkripci genů v dosahu *LexAop* (BRENT and PTASHNE 1981; LITTLE *et al.* 1981; WERTMAN and MOUNT 1985). Konzervativní povaha mechanismu represe pomocí LexA umožnila jeho aplikaci mj. u *Saccharomyces cerevisiae* (BRENT and PTASHNE 1984, 1985), *Drosophila melanogaster* (SZÜTS and BIENZ 2000; LAI and LEE 2006) i *Danio rerio* (EMELYANOV and PARINOV 2008). V kombinaci s *GAL4/UAS* systémem se *LexA-LexAop* systém využívá pro konstrukci alternativních nástrojů genového mozaicismu, založených na modifikaci *MARCM*. Tzv. „dual expression control *MARCM*“ (*DEC-MARCM*), umožňuje hned několik možných přístupů ke značení rekombinovaných buněk (LAI and LEE 2006). Na *GAL4/UAS* systému nezávislou vizualizaci pozadí zprostředkovaně umožňuje hybridní protein LexA-DBD-VP16₄₁₃₋₄₇₀, regulovaný endogenním elementem – vazbou na *LexAop* dochází k indukci transkripce proteinového reportéru A. Gen pro hybridní protein LexA-DBD-VP16₄₁₃₋₄₇₀ je integrován ve stejném lokusu, jako *GAL80* (LAI and LEE 2006), vizualizaci tkáně, které po mitotické rekombinaci chybí gen *GAL80*, zprostředkovávají původní složky *MARCM* – Gal4p a regulační element *UAS*, který kontroluje expresi reportérového proteinu B (LEE and LUO 1999; LAI and LEE 2006). Odlišná varianta *DEC-MARCM* je koncipována pro vizualizaci odlišných typů buněk a využívá specifických promotorů, aktivních jen v té které tkáni. Ty nezávisle na sobě exprimují buď fúzovaný protein LexA-DBD-Gal4p-AD (s následující expresí reportérového proteinu A pod kontrolou *LexAop*) nebo nativní transkripční faktor Gal4p (s následující expresí reportérového proteinu B pod kontrolou *UAS*). K vizualizaci tkáně dochází jen u buněk, které jsou po mitotické rekombinaci v homozygotní konstituci pro jeden ze zmíněných transkripčních faktorů (LAI and LEE 2006). Analogicky k *split-GAL4* systému byl vytvořen *split-LexA* systém, kombinovatelný s existujícími *GAL4/UAS* liniemi (TING *et al.* 2011).

Mladším „sourozencem“ předešlého binárního nástroje je *Q*-systém, vytvořen pro potřeby ektopické exprese z regulačních genů metabolismu pro degradaci kyseliny chinové, získaných z organismu *Neurospora crassa* (PATEL *et al.* 1981; POTTER *et al.* 2010). Tato metabolická dráha

vykazuje podobné rysy regulace (mj. striktní represe na genové úrovni, odezva na úzký okruh substrátů), jaké se vyskytují u galaktosového metabolismu *Saccharomyces cerevisiae* (LOHR *et al.* 1995; TANG *et al.* 2011). Základem Q-systému je transkripční faktor qa-1F, odpovědný za transkripci vazbou ke specifické sekvenci, tzv. *QUAS* („Q-system upstream activating sequence), nacházející se (i v několika kopiích) před regulovaným genem (BAUM *et al.* 1987); indukční aktivita faktoru qa-1F je potlačena vazbou represoru qa-1S (HUIET and GILES 1986). Oproti *LexA-LexAop* systému vykazuje Q-systém nižší míru bazální exprese (POTTER *et al.* 2010) a nabízí tedy výhodnější alternativu k široce užívanému *GAL4/UAS* systému. Velikou výhodou nabízí povaha represoru qa-1S, jehož aktivitu je možné potlačit kyselinou chinovou (GILES *et al.* 1991), kterou lze experimentálním jedincům *Drosophila melanogaster* podávat např. v potravě. Pro dosažení stejného efektu u represoru Gal80p (termosensitivní varianta) je nutné podrobit gen *GAL80* komplikovaným procedurám genového inženýrství (MCGUIRE *et al.* 2003). Analogicky k nástroji *MARCM* byla vyvinuta technika *Q-MARCM* („Q-system mosaic analysis with a repressible cell marker“), postavená na totožných principech (POTTER *et al.* 2010). Obě techniky genového mozaicismu je možné propojit několika způsoby; nezávislou integraci jednotlivých komponent do odlišných chromozálních ramen lze po mitotické rekombinaci vizualizovat široké spektrum buněk („independent double system mosaic analysis with a repressible cell marker“ - *ID-MARCM*). Klíčové komponenty obou systémů (geny *GAL80* a *QA-1S*) lze popř. integrovat do stejného páru homologních chromozomů v trans-postavení (*C-MARCM* – „coupled MARCM“), čímž je možné dosáhnout exprese reportérových proteinů za striktně definovaných podmínek (POTTER *et al.* 2010).

3. Aplikace *GAL4/UAS* systému v základním výzkumu

3.1. Identifikace funkce genů a řídicích elementů genové exprese

Fyzickou entitou *GAL4/UAS* nástroje jsou systematicky udržované linie organismů, které nesou na určitém místě svého genomu *GAL4*, popř. *UAS* sekvenci. Při generování transgenních linií sehrály zásadní roli mj. techniky „enhancer trap“ (ET) a „gene trap“ (GT), které navíc umožnily identifikovat mnoho nových regulačních elementů a genů (viz dále). Většina těchto linií je dostupná široké vědecké veřejnosti a lze také využít elektronické databáze pro vyhledání organismu, nesoucího inzerci ve specifické genomové sekvenci (viz tabulka 1).

ET ve své původní podobě byl nástrojem pro identifikaci a přímou vizualizaci aktivity regulačních elementů organismu *Drosophila melanogaster* (O’KANE and GEHRING 1987), význam této techniky byl však plně doceněn teprve při integraci komponent *GAL4/UAS*, opatřených transgenním promotorem, do náhodných míst genomu (BRAND and PERRIMON 1993). Souhra

Organizace / Projekt	Dostupné linie						Odkaz
	GAL4	UAS	GAL80	InSITE	MARCM	Q-systém	
<i>Drosophila melanogaster</i>							
Bloomington Drosophila Stock Center	■	■	■	■	■	■	http://flystocks.bio.indiana.edu/
Drosophila Genomics Resource Center	■	■	■	■	■	■	https://dgrc.cgb.indiana.edu/
Kyoto Stock Center	■	■	■	■	■	■	http://www.dgrc.kit.ac.jp
Vienna Drosophila Resource Center	■	■	■	■	■	■	http://stockcenter.vdrc.at
Zurich ORFeome Project	■	■	■	■	■	■	http://flyorf.ch
<i>Danio rerio</i>							
European Zebrafish Resource Center	■	■	■	■	■	■	http://www.ezrc.kit.edu
Zebrafish International Resource Center	■	■	■	■	■	■	http://zebrafish.org
<i>Xenopus laevis / tropicalis</i>							
European Xenopus Resource Centre	■	■	■	■	■	■	http://www.port.ac.uk/research/exrc/
The National Xenopus Resource	■	■	■	■	■	■	http://www.mbl.edu/xenopus/
<i>Mus musculus</i>							
The Jackson Laboratory	■	■	■	■	■	■	http://www.jax.org/
<i>Arabidopsis thaliana</i>							
Arabidopsis Biological Resource Center	■	■	■	■	■	■	http://abrc.osu.edu
The European Arabidopsis Stock Centre	■	■	■	■	■	■	http://arabidopsis.info

Tab. 1 – přehled nejdůležitějších center s dostupnými liniemi pro *GAL4/UAS* systém a spřízněné techniky. Informace platné ke dni 12.5.2014.

zmíněných nástrojů vedla k obrovské expanzi vzájemně kombinovatelných transgenních linií s potenciálem vysoce specifické ektopické exprese napříč spektrem všech tkání *Drosophila melanogaster* (BRAND and PERRIMON 1993; RØRTH *et al.* 1998) i *Danio rerio* (ASAKAWA and KAWAKAMI 2008; OGURA *et al.* 2009). Podstatná část *GAL4* linií *Drosophila melanogaster* byla vytvořena (v rámci projektu *Fly Light*) ΦC31 specifickou rekombinací sekvence, obsahující krom promotoru a *GAL4* genu také definovaný regulační element (PFEIFFER *et al.* 2008; JENETT *et al.* 2012). Tento projekt mj. umožnil také systematickou identifikaci regulačních elementů vybraných genů (JENETT *et al.* 2012).

Identifikaci role genů a jejich primární struktury umožňuje v kontextu *GAL4/UAS* systému technika GT (LUKACSOVICH *et al.* 2001). Princip GT spočívá v náhodné integraci transgenní sekvence (např. *GAL4*), postrádající promotor. Transgenní gen je na 5' konci opatřen krátkou sekvencí („splice acceptor“ – SA), rozeznávanou na úrovni hnRNA sestřihovým aparátem (MOUNT *et al.* 1992), na 3' konci se nachází polyadenylační sekvence pro terminace transkripce. V případě integrace transgenní

sekvence do intronu dochází při sesřihu k fůzi endogenních exonů s transgenní sekvencí - produktem následné proteosyntézy je zkrácená, zpravidla nefunkční verze původního genu, prodloužená o zmiňovanou transgenní sekvenci, která často vykazuje určitou míru funkčnosti (GOSSLER *et al.* 1989; SKARNES *et al.* 1992; LUKACSOVICH *et al.* 2001). V případě syntézy hybridního proteinu s Gal4p sekvencí je možné vizualizovat tuto aktivitu po integraci GT sekvence v následující generaci vhodným reportérovým proteinem, regulovaným *UAS* elementem (LUKACSOVICH *et al.* 2001). Zatímco odezva (míra exprese) transgenního reportérového proteinu v případě ET integrace reflektuje vzdálenost od nejbližší regulační sekvence, popř. souběžný vliv více regulačních elementů (BOLWIG *et al.* 1995), GT poskytuje výhodu přímé vizualizace aktivity endogenního promotoru v podobě exprese hybridního genu, jehož částečnou sekvenci (odvozenou od příslušné mRNA) lze navíc získat a využít ho pro další studie (LUKACSOVICH *et al.* 2001). Mutagenní potenciál GT techniky našel využití především u *Danio rerio*, kde je využíván pro genový *knock-down* v kombinaci s modifikovanými variantami transkripčního faktoru Gal4p (ASAKAWA *et al.* 2008; BALCIUNIENE *et al.* 2013).

3.2. Metody vizualizace

Otázka úspěšné metamorfózy studovaného organismu je základním pilířem takřka všech metod genového inženýrství. Uvedení nové techniky do praxe je podmíněno požadavkem na jednoduché a rychlé odlišení jedinců studovaného organismu, u kterých došlo ke kýžené změně na úrovni genomu. To je umožněno integrací tzv. markeru mezi základní komponenty technik genového inženýrství; jde o gen s výrazným projevem na úrovni fenotypu, jehož přítomnost signalizuje úspěšnou genetickou modifikaci. Sofistikovanější metody vizualizace (např. specifického okruhu tkání) pak mohou být i primárním důvodem tvorby transgenních organismů.

Počátky vizualizace funkčního *GAL4/UAS* systému v kontextu živých buněk *Drosophila melanogaster* jsou spjaty s expresí genu *LacZ* (FISCHER *et al.* 1988; BRAND and PERRIMON 1993), kódujícího enzym β -galaktosidasu (EC: 3.2.1.23). Ta katalyzuje hydrolytickou přeměnu bílého 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktosidu (X-Gal) na indigově zbarvené komponenty (shrnutu v KIERNAN 2007). Obtíže, spojené s dopravou tohoto substrátu do buněk, vykazujících ektopickou expresi, vedly k upřednostnění β -galaktosidasových protilátek (PHELPS and BRAND 1998).

Milníkem vizualizace *in vivo* se stalo zavedení fluorescenčního proteinu GFP („green fluorescent protein“) do laboratorní praxe, izolovaného z mořské medůzy *Aequorea victoria* (SHIMOMURA *et al.* 1962; CHALFIE *et al.* 1994). Základem GFP a mnoha dalších fluorescenčních proteinů je chromofor, emitující po ozáření světlo určité vlnové délky; chromoforový komplex je obklopen rigidní, konzervovanou strukturou β -barelu (shrnutu v REMINGTON 2006). Zásadní výhodou

GFP je jeho snadná vizualizace prostým ozářením – odpadá nutnost invazivních zásahů (CHALFIE *et al.* 1994). V následujících letech bylo izolováno - popř. mutagenézí vytvořeno - obrovské množství fluorescenčních proteinů (FP), emitujících vlnové délky téměř celého barevného spektra (shrnutí v CHUDAKOV *et al.* 2010). V současnosti pro výzkum dostupné FP je možné vizualizovat světelným pulzem (*Citrine*, *Cerulean*, *mCherry*) (GRIESBECK *et al.* 2001; RIZZO *et al.* 2004; SHANER *et al.* 2004), indukovat u nich reversibilní (*Dronpa*) (HABUCHI *et al.* 2005) i ireversibilní barevnou změnu (*Kaede*) (ANDO *et al.* 2002), popř. je spřáhnout s efektorovou funkcí (viz kap. 3.3). FP byly na genové úrovni modifikovány také za účelem zvýšení jejich stability ve vyšších teplotách a extrémnějších hodnotách pH a pro časnější možnost vizualizace po proteosyntéze. Tendence FP vytvářet komplexnější kvarterní struktury (dimery, tetramery apod.) vedla - kvůli minimalizaci rizika interference s endogenními buněčnými pochody – ke tvorbě stabilních monomerů (shrnutí v CHUDAKOV *et al.* 2010). První UAS-FP vizualizační linie byly představeny krátce po konstrukci tohoto bipartitního systému (YEH *et al.* 1995; BRAND 1995), vyniknout jim ale daly studie, postavené na genovém mozaicismu (viz kap. 3.3 a 2.4).

3.3. Neurobiologie

Vyšetřování funkce různých tkání a orgánů během ontogenetického vývoje, studium mechanismů učení a snaha o určení funkce jednotlivých nervových obvodů *Drosophila melanogaster* i *Danio rerio* jsou jen neúplným příkladem oblastí, ve kterých bylo pomocí GAL4/UAS systému dosaženo signifikantních výsledků. Důležitým aspektem těchto studií jsou UAS linie, řídící expresi různých (často letálních) efektorových proteinů, které je ve většině případů možné dirigovat i na úrovni proteinu vnějším podnetem. Pro neurologické studie získal – v rámci antropocentrického přístupu - výsadní postavení obratlovec *Danio rerio*, zčásti díky transparentnosti larev, umožňující sledovat a ovlivňovat neurologické pochody *in vivo*.

Počátky neurogenetických přístupů byly zaměřeny především na morfologickou strukturu neuronů a jejich vzájemné propojení (SUN *et al.* 1999; SCOTT *et al.* 2007); přesnější vizualizaci neurologických struktur umožnila fúze FP s membránovými komponentami (ITO *et al.* 1997; LEE and LUO 1999). Pozorování synapsí se zpočátku orientovalo na rekonstrukci membránových komponent FP v místě synapsí (split-GFP) (GORDON and SCOTT 2009), později se pozornost vědecké komunity zaměřila na stochastickou expresi FP odlišných barev, umožňující studovat vzájemnou neurologickou konektivitu ve vysokém rozlišení (LEE and LUO 1999; HADJIECONOMOU *et al.* 2011; HAMPEL *et al.* 2011; PAN *et al.* 2013). Výsledkem je interaktivní mapa nervových obvodů *Drosophila melanogaster*, tzv. *FlyCircuit*² (CHIANG *et al.* 2011); podobnou konektomickou aplikaci rozvíjí též *Fly Light Project* a *Fly EM* (JENETT *et al.* 2012; PLAZA *et al.* 2014).

² <http://www.flycircuit.tw>

Svatým grálem neurologického výzkumu je ukotvení behaviorálních projevů do genového kontextu. Aktivitu neuronů lze sledovat pomocí FP, které jsou fúzovány s komponentami, reagujícími na výkyvy gradientů určitých látek během přenosu akčního potenciálu; využít lze např. G-CaMP (ligandem Ca^{2+}) (REIFF *et al.* 2005), popř. pHluorin (aktivita dle pH) (MIESENBÖCK *et al.* 1998). Přenos akčního potenciálu lze blokovat expresí tetanospasminového α -řetězce (dochází k inaktivaci sekrece určitých neurotransmiterů) (SWEENEY *et al.* 1995; ASAKAWA and KAWAKAMI 2008). Relativně snadnou manipulaci s neurony umožňují optogenetické metody; nervovou aktivitu u iniciuje po světelném pulzu prokaryotní channelrhodopsin-2 (Chr2), který se podílí na tvorbě akčního potenciálu indukcí změny intracelulární koncentrace různých kationtů (NAGEL *et al.* 2003). Experimentálním využitím Chr2 byl např. u *Danio rerio* identifikován okruh, zodpovědný za únikový reflex (DOUGLASS *et al.* 2008).

Razantnější metodou pro určení toho, zda je určitý okruh neuronů pro určité chování esenciální (popř. zda je jeho příspěvek k danému chování epistatické povahy) je ablace daných buněk. V případě *Drosophila melanogaster* je účinným ablačním efektoem produkt genu *reaper* (WHITE *et al.* 1996), popř. modifikovaná verze toxinu („diphtheria toxin A mutant I“), odpovědného za klinické projevy záškrtu (BELLEN *et al.* 1992). U *Danio rerio* je k ablací buněk možné využít FP *KillerRed*, u kterého lze světelným pulzem indukovat produkci vysoce toxických kyslíkových radikálů (TEH *et al.* 2010).

Závěr

Tato práce shrnuje hlavní směry, kterými se *GAL4/UAS* systém během své více než dvě dekády trvající existence ubíral. Ač bylo pomocí tohoto nástroje získáno mnoho informací napříč celým spektrem biologických oborů, existuje nadále mnoho oblastí, ve kterých se může potenciál *GAL4/UAS* systému uplatnit.

Dosud byl tento nástroj aplikován v drtivé většině pro experimentální studium modelových organismů *Drosophila melanogaster* a *Danio rerio*; mj. byly vygenerovány tisíce *GAL4/UAS* linií, které jsou udržovány v chovných stanicích po celém světě a které jsou relativně snadno dostupné široké vědecké komunitě. Přestože byly studiem těchto organismů získány neocenitelné znalosti, ani jeden z organismů není příliš vhodný např. pro farmakologické screeniny a zdravotní studie – získaná data nemají pro vztáhnutí na lidskou fyziologii dostatečnou vypovídající hodnotu. Stejným problémem je pak uplatnění informací, získaných studiem centrálního nervového systému (CNS) *Danio rerio*, na architekturu lidského nervového systému. Pokud se má *GAL4/UAS* systém v tomto směru více angažovat, je potřebné zajistit potřebný výzkum pro snadnou tvorbu *GAL4/UAS* linií u dalších organismů (nabízí se např. *Mus musculus*) a vybudovat příslušnou infrastrukturu pro jejich chov. Určité úsili by mělo směřovat k optimalizaci techniky, zejména co se týče jevů bazální transkripce za represivních podmínek a nechtěného genového mozaicismu.

Stranou *GAL4/UAS* systému se nabízí hlubší studium enzymů galaktosového metabolismu *Saccharomyces cerevisiae* – přestože je regulace tohoto metabolického okruhu modelem pro výzkum mechanismu transkripce, dosud nebyla zjištěna prostorová struktura mnoha enzymů, které se degradace galaktosy účastní.

Literatura

- ANDO R., HAMA H., YAMAMOTO-HINO M., MIZUNO H., MIYAWAKI A., 2002 An optical marker based on the UV-induced green-to-red photoconversion of a fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**: 12651–12656.
- ASAKAWA K., KAWAKAMI K., 2008 Targeted gene expression by the Gal4-UAS system in zebrafish. *Dev. Growth Differ.* **50**: 391–399.
- ASAKAWA K., SUSTER M. L., MIZUSAWA K., NAGAYOSHI S., KOTANI T., URASAKI A., KISHIMOTO Y., HIBI M., KAWAKAMI K., 2008 Genetic dissection of neural circuits by Tol2 transposon-mediated Gal4 gene and enhancer trapping in zebrafish. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**: 1255–1260.
- AUER T. O., BENE F. DEL, 2014 CRISPR/Cas9 and TALEN-mediated knock-in approaches in zebrafish. *Methods*.
- AUER T. O., DUROURE K., CIAN A. DE, CONCORDET J.-P., BENE F. DEL, 2014 Highly efficient CRISPR/Cas9-mediated knock-in in zebrafish by homology-independent DNA repair. *Genome Res.* **24**: 142–53.
- AUSLÄNDER S., FUSSENEGGER M., 2013 From gene switches to mammalian designer cells: Present and future prospects. *Trends Biotechnol.* **31**: 155–167.
- BALCIUNIENE J., NAGELBERG D., WALSH K., CAMEROTA D., GEORLETTE D., BIEMAR F., BELLIPANNI G., BALCIUNAS D., 2013 Efficient disruption of Zebrafish genes using a Gal4-containing gene trap. *BMC Genomics* **14**: 619.
- BARLEV N. A., CANDAU R., WANG L., DARPINO P., SILVERMAN N., BERGER S. L., 1995 Characterization of physical interactions of the putative transcriptional adaptor, ADA2, with acidic activation domains and TATA-binding protein. *J. Biol. Chem.* **270**: 19337–19344.
- BASSEL J., MORTIMER R., 1971 Genetic order of the galactose structural genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **108**: 179–183.
- BAUM J. A., GEEVER R., GILES N. H., 1987 Expression of qa-1F activator protein: identification of upstream binding sites in the qa gene cluster and localization of the DNA-binding domain. *Mol. Cell. Biol.* **7**: 1256–1266.
- BELLEN H. J., D'EVELYN D., HARVEY M., ELLEDGE S. J., 1992 Isolation of temperature-sensitive diphtheria toxins in yeast and their effects on *Drosophila* cells. *Development* **114**: 787–796.
- BHAT P. J., HOPPER J. E., 1992 Overproduction of the GAL1 or GAL3 protein causes galactose-independent activation of the GAL4 protein: evidence for a new model of induction for the yeast GAL/MEL regulon. *Mol. Cell. Biol.* **12**: 2701–2707.
- BHAT P. J., MURTHY T. V., 2001 Transcriptional control of the GAL/MEL regulon of yeast *Saccharomyces cerevisiae*: mechanism of galactose-mediated signal transduction. *Mol. Microbiol.* **40**: 1059–1066.
- BHAUMIK S. R., GREEN M. R., 2001 SAGA is an essential in vivo target of the yeast acidic activator Gal4p. *Genes Dev.* **15**: 1935–1945.
- BOHM R. A., WELCH W. P., GOODNIGHT L. K., COX L. W., HENRY L. G., GUNTER T. C., BAO H., ZHANG B., 2010 A genetic mosaic approach for neural circuit mapping in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**: 16378–16383.
- BOLWIG G. M., VECCHIO M. DEL, HANNON G., TULLY T., 1995 Molecular cloning of linotte in *Drosophila*: a novel gene that functions in adults during associative learning. *Neuron* **15**: 829–842.
- BOULINA M., SAMARAJEEWA H., BAKER J. D., KIM M. D., CHIBA A., 2013 Live imaging of multicolor-labeled cells in *Drosophila*. *Development* **140**: 1605–13.
- BRAND A., 1995 GFP in *Drosophila*. *Trends Genet.* **11**: 324–325.
- BRAND A. H., MANOUKIAN A. S., PERRIMON N., 1994 Ectopic expression in *Drosophila*. In: *Drosophila melanogaster: practical uses in cell and molecular biology.*, pp. 635–654.
- BRAND A. H., PERRIMON N., 1993 Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* **118**: 401–415.
- BRENT R., PTASHNE M., 1981 Mechanism of action of the *lexA* gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **78**: 4204–4208.
- BRENT R., PTASHNE M., 1984 A bacterial repressor protein or a yeast transcriptional terminator can block upstream activation of a yeast gene. *Nature* **312**: 612–615.
- BRENT R., PTASHNE M., 1985 A eukaryotic transcriptional activator bearing the DNA specificity of a prokaryotic repressor. *Cell* **43**: 729–736.

- BRINSTER R. L., CHEN H. Y., TRUMBAUER M. E., YAGLE M. K., PALMITER R. D., 1985 Factors affecting the efficiency of introducing foreign DNA into mice by microinjecting eggs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**: 4438–4442.
- BRYANT P. J., SCHNEIDERMAN H. A., 1969 Cell lineage, growth, and determination in the imaginal leg discs of *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* **20**: 263–290.
- BURCIN M. M., SCHIEDNER G., KOCHANNEK S., TSAI S. Y., O'MALLEY B. W., 1999 Adenovirus-mediated regulable target gene expression in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**: 355–360.
- CAMBRIDGE S. B., DAVIS R. L., MINDEN J. S., 1997 *Drosophila* mitotic domain boundaries as cell fate boundaries. *Science* **277**: 825–828.
- CIRILLO V. P., 1968 Galactose transport in *Saccharomyces cerevisiae*. I. Nonmetabolized sugars as substrates and inducers of the galactose transport system. *J. Bacteriol.* **95**: 1727–1731.
- COLLINS R. T., LINKER C., LEWIS J., 2010 MAZe: a tool for mosaic analysis of gene function in zebrafish. *Nat. Methods* **7**: 219–223.
- CONG L., RAN F. A., COX D., LIN S., BARRETTO R., HABIB N., HSU P. D., WU X., JIANG W., MARRAFFINI L. a, ZHANG F., 2013 Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* **339**: 819–23.
- COOLEY L., KELLEY R., SPRADLING A., 1988 Insertional mutagenesis of the *Drosophila* genome with single P elements. *Science* **239**: 1121–1128.
- DAVIDSON A. E., BALCIUNAS D., MOHN D., SHAFFER J., HERMANSON S., SIVASUBBU S., CLIFF M. P., HACKETT P. B., EKKER S. C., 2003 Efficient gene delivery and gene expression in zebrafish using the Sleeping Beauty transposon. *Dev. Biol.* **263**: 191–202.
- DIETZL G., CHEN D., SCHNORRER F., SU K.-C., BARINOVA Y., FELLNER M., GASSER B., KINSEY K., OPPEL S., SCHEIBLAUER S., COUTO A., MARRA V., KELEMAN K., DICKSON B. J., 2007 A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*. *Nature* **448**: 151–156.
- DOUGLAS H. C., HAWTHORNE D. C., 1964 Enzymatic expression and genetic linkage of genes controlling galactose utilization in *Saccharomyces*. *Genetics* **49**: 837–844.
- DOUGLAS H. C., HAWTHORNE D. C., 1966 Regulation of genes controlling synthesis of the galactose pathway enzymes in yeast. *Genetics* **54**: 911–916.
- DOUGLASS A. D., KRAVES S., DEISSEROTH K., SCHIER A. F., ENGERT F., 2008 Escape Behavior Elicited by Single, Channelrhodopsin-2-Evoked Spikes in Zebrafish Somatosensory Neurons. *Curr. Biol.* **18**: 1133–1137.
- DUPUY A. J., FRITZ S., LARGAESPADA D. A., 2001 Transposition and gene disruption in the male germline of the mouse. *Genesis* **30**: 82–88.
- EGRIBOZ O., GOSWAMI S., TAO X., DOTTS K., SCHAEFFER C., PILAURI V., HOPPER J. E., 2013 Self-association of the Gal4 inhibitor protein Gal80 is impaired by Gal3: evidence for a new mechanism in the GAL gene switch. *Mol. Cell. Biol.* **33**: 3667–74.
- EGRIBOZ O., JIANG F., HOPPER J. E., 2011 Rapid GAL Gene Switch of *Saccharomyces cerevisiae* Depends on Nuclear Gal3, Not Nucleocytoplasmic Trafficking of Gal3 and Gal80. *Genetics* **189**: 825–836.
- ELLIOTT D. A., BRAND A. H., 2008 The GAL4 system: a versatile system for the expression of genes. *Methods Mol. Biol.* **420**: 79–95.
- EMELYANOV A., PARINOV S., 2008 Mifepristone-inducible LexPR system to drive and control gene expression in transgenic zebrafish. *Dev. Biol.* **320**: 113–121.
- ESENGIL H., CHANG V., MICH J. K., CHEN J. K., 2007 Small-molecule regulation of zebrafish gene expression. *Nat. Chem. Biol.* **3**: 154–155.
- ESVELT K. M., WANG H. H., 2013 Genome-scale engineering for systems and synthetic biology. *Mol. Syst. Biol.* **9**: 641.
- EVANS C. J., OLSON J. M., NGO K. T., KIM E., LEE N. E., KUOY E., PATANANAN A. N., SITZ D., TRAN P., DO M.-T., YACKLE K., CESPEDES A., HARTENSTEIN V., CALL G. B., BANERJEE U., 2009 G-TRACE: rapid Gal4-based cell lineage analysis in *Drosophila*. *Nat. Methods* **6**: 603–605.
- FAUCHERRE A., LÓPEZ-SCHIER H., 2011 Delaying Gal4-Driven Gene Expression in the Zebrafish with Morpholinos and Gal80. *PLoS One* **6**: e16587.
- FIELDS S., SONG O., 1989 A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**: 245–246.
- FIRE A., XU S., MONTGOMERY M. K., KOSTAS S. A., DRIVER S. E., MELLO C. C., 1998 Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**: 806–811.

- FISCHER J. A., GINIGER E., MANIATIS T., PTASHNE M., 1988 GAL4 activates transcription in *Drosophila*. *Nature* **332**: 853–856.
- FORD D., HOE N., LANDIS G. N., TOZER K., LUU A., BHOLE D., BADRINATH A., TOWER J., 2007 Alteration of *Drosophila* life span using conditional, tissue-specific expression of transgenes triggered by doxycycline or RU486/Mifepristone. *Exp. Gerontol.* **42**: 483–497.
- FREY P. A., 1996 The Leloir pathway: a mechanistic imperative for three enzymes to change the stereochemical configuration of a single carbon in galactose. *FASEB J.* **10**: 461–470.
- FROMM M., TAYLOR L. P., WALBOT V., 1985 Expression of genes transferred into monocot and dicot plant cells by electroporation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**: 5824–5828.
- FUJIMOTO E., GAYNES B., BRIMLEY C. J., CHIEN C.-B., BONKOWSKY J. L., 2011 Gal80 intersectional regulation of cell-type specific expression in vertebrates. *Dev. Dyn.* **240**: 2324–34.
- GAJ T., GERSBACH C. A., BARBAS C. F., 2013 ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol.* **31**: 397–405.
- GERETY S. S., BREAU M. A., SASAI N., XU Q., BRISCOE J., WILKINSON D. G., 2013 An inducible transgene expression system for zebrafish and chick. *Development* **140**: 2235–43.
- GEURTS A. M., YANG Y., CLARK K. J., LIU G., CUI Z., DUPUY A. J., BELL J. B., LARGAESPADA D. A., HACKETT P. B., 2003 Gene transfer into genomes of human cells by the Sleeping Beauty transposon system. *Mol. Ther.* **8**: 108–117.
- GILES N. H., GEEVER R. F., ASCH D. K., AVALOS J., CASE M. E., 1991 Organization and Regulation of the Qa (Quinic Acid) Genes in *Neurospora crassa* and Other Fungi. *J. Hered.* **82** : 1–7.
- GINIGER E., PTASHNE M., 1988 Cooperative DNA binding of the yeast transcriptional activator GAL4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **85**: 382–386.
- GINIGER E., VARNUM S. M., PTASHNE M., 1985 Specific DNA binding of GAL4, a positive regulatory protein of yeast. *Cell* **40**: 767–774.
- GOHL D. M., SILIES M. A., GAO X. J., BHALERAU S., LUONGO F. J., LIN C.-C., POTTER C. J., CLANDININ T. R., 2011 A versatile in vivo system for directed dissection of gene expression patterns. *Nat. Methods* **8**: 231–237.
- GOLIC K. G., LINDQUIST S., 1989 The FLP recombinase of yeast catalyzes site-specific recombination in the *Drosophila* genome. *Cell* **59**: 499–509.
- GORDON J. W., SCANGOS G. A., PLOTKIN D. J., BARBOSA J. A., RUDDLE F. H., 1980 Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **77**: 7380–7384.
- GORDON M. D., SCOTT K., 2009 Motor Control in a *Drosophila* Taste Circuit. *Neuron* **61**: 373–384.
- GOSSEN M., BUJARD H., 1992 Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**: 5547–5551.
- GOSSEN M., FREUNDLIEB S., BENDER G., MÜLLER G., HILLEN W., BUJARD H., 1995 Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* **268**: 1766–1769.
- GOSSLER A., JOYNER A. L., ROSSANT J., SKARNES W. C., 1989 Mouse embryonic stem cells and reporter constructs to detect developmentally regulated genes. *Science* **244**: 463–465.
- GRIESBECK O., BAIRD G. S., CAMPBELL R. E., ZACHARIAS D. A., TSIEN R. Y., 2001 Reducing the environmental sensitivity of yellow fluorescent protein. Mechanism and applications. *J. Biol. Chem.* **276**: 29188–29194.
- GRIFFIN R., BINARI R., PERRIMON N., 2014 Genetic odyssey to generate marked clones in *Drosophila* mosaics. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111** : 4756–4763.
- GRIFFIN R., SUSTAR A., BONVIN M., BINARI R., VALLE RODRIGUEZ A. DEL, HOHL A. M., BATEMAN J. R., VILLALTA C., HEFFERN E., GRUNWALD D., BAKAL C., DESPLAN C., SCHUBIGER G., WU C., PERRIMON N., 2009 The twin spot generator for differential *Drosophila* lineage analysis. *Nat. Methods* **6**: 600–602.
- GUARENTE L., YOCUM R. R., GIFFORD P., 1982 A GAL10-CYC1 hybrid yeast promoter identifies the GAL4 regulatory region as an upstream site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **79**: 7410–7414.
- HABUCHI S., ANDO R., DEDECKER P., VERHEIJEN W., MIZUNO H., MIYAWAKI A., HOFKENS J., 2005 Reversible single-molecule photoswitching in the GFP-like fluorescent protein Dronpa. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**: 9511–9516.
- HADJIECONOMOU D., ROTKOPF S., ALEXANDRE C., BELL D. M., DICKSON B. J., SALECKER I., 2011 Flybow: genetic multicolor cell labeling for neural circuit analysis in *Drosophila melanogaster*. *Nat. Methods* **8**: 260–266.

- HALFON M. S., KOSE H., CHIBA A., KESHISHIAN H., 1997 Targeted gene expression without a tissue-specific promoter: creating mosaic embryos using laser-induced single-cell heat shock. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**: 6255–6260.
- HALLORAN M. C., SATO-MAEDA M., WARREN J. T., SU F., LELE Z., KRONE P. H., KUWADA J. Y., SHOJI W., 2000 Laser-induced gene expression in specific cells of transgenic zebrafish. *Development* **127**: 1953–1960.
- HALPERN M. E., RHEE J., GOLL M. G., AKITAKE C. M., PARSONS M., LEACH S. D., 2008 Gal4/UAS transgenic tools and their application to zebrafish. *Zebrafish* **5**: 97–110.
- HAMPEL S., CHUNG P., MCKELLAR C. E., HALL D., LOOGER L. L., SIMPSON J. H., 2011 Drosophila Brainbow: a recombinase-based fluorescence labeling technique to subdivide neural expression patterns. *Nat. Methods* **8**: 253–259.
- HAN D. D., STEIN D., STEVENS L. M., 2000 Investigating the function of follicular subpopulations during Drosophila oogenesis through hormone-dependent enhancer-targeted cell ablation. *Development* **127**: 573–583.
- HEIDMANN D., LEHNER C. F., 2001 Reduction of Cre recombinase toxicity in proliferating Drosophila cells by estrogen-dependent activity regulation. *Dev. Genes Evol.* **211**: 458–465.
- HUIET L., GILES N. H., 1986 The qa repressor gene of *Neurospora crassa*: wild-type and mutant nucleotide sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**: 3381–3385.
- CHAE J., ZIMMERMAN L. B., GRAINGER R. M., 2002 Inducible control of tissue-specific transgene expression in *Xenopus tropicalis* transgenic lines. *Mech. Dev.* **117**: 235–241.
- CHALFIE M., TU Y., EUSKIRCHEN G., WARD W. W., PRASHER D. C., 1994 Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**: 802–805.
- CHANG N., SUN C., GAO L., ZHU D., XU X., ZHU X., XIONG J.-W., XI J. J., 2013 Genome editing with RNA-guided Cas9 nuclease in zebrafish embryos. *Cell Res.* **23**: 465–72.
- CHEN C., OKAYAMA H., 1987 High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol. Cell. Biol.* **7**: 2745–2752.
- CHIANG A. S., LIN C. Y., CHUANG C. C., CHANG H. M., HSIEH C. H., YEH C. W., SHIH C. T., WU J. J., WANG G. T., CHEN Y. C., WU C. C., CHEN G. Y., CHING Y. T., LEE P. C., LIN C. Y., LIN H. H., WU C. C., HSU H. W., HUANG Y. A., CHEN J. Y., CHIANG H. J., LU C. F., NI R. F., YEH C. Y., HWANG J. K., 2011 Three-dimensional reconstruction of brain-wide wiring networks in drosophila at single-cell resolution. *Curr. Biol.* **21**: 1–11.
- CHRISTIAN M., CERMAK T., DOYLE E. L., SCHMIDT C., ZHANG F., HUMMEL A., BOGDANOVA A. J., VOYTAS D. F., 2010 Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics* **186**: 757–761.
- CHUDAKOV D. M., MATZ M. V., LUKYANOV S., LUKYANOV K. A., 2010 Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues. *Physiol. Rev.* **90**: 1103–1163.
- IMAMURA M., NAKAI J., INOUE S., QUAN G. X., KANDA T., TAMURA T., 2003 Targeted gene expression using the GAL4/UAS system in the silkworm *Bombyx mori*. *Genetics* **165**: 1329–1340.
- ITO K., AWANO W., SUZUKI K., HIROMI Y., YAMAMOTO D., 1997 The Drosophila mushroom body is a quadruple structure of clonal units each of which contains a virtually identical set of neurones and glial cells. *Development* **124**: 761–771.
- IVICS Z., HACKETT P. B., PLASTERK R. H., IZSVÁK Z., 1997 Molecular reconstruction of Sleeping Beauty, a Tc1-like transposon from fish, and its transposition in human cells. *Cell* **91**: 501–510.
- JANION C., 2008 Inducible SOS response system of DNA repair and mutagenesis in *Escherichia coli*. *Int. J. Biol. Sci.* **4**: 338–344.
- JENETT A., RUBIN G. M., NGO T. T. B., SHEPHERD D., MURPHY C., DIONNE H., PFEIFFER B. D., CAVALLARO A., HALL D., JETER J., IYER N., FETTER D., HAUSENFLUCK J. H., PENG H., TRAUTMAN E. T., SVIRSKAS R. R., MYERS E. W., IWINSKI Z. R., ASO Y., DEPASQUALE G. M., ENOS A., HULAMM P., LAM S. C. B., LI H. H., LAVERTY T. R., LONG F., QU L., MURPHY S. D., ROKICKI K., SAFFORD T., SHAW K., SIMPSON J. H., SOWELL A., TAE S., YU Y., ZUGATES C. T., 2012 A GAL4-Driver Line Resource for Drosophila Neurobiology. *Cell Rep.* **2**: 991–1001.
- JOHNSTON M., 1987 A model fungal gene regulatory mechanism: the GAL genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* **51**: 458–476.
- JOHNSTON M., FLICK J. S., PEXTON T., 1994 Multiple mechanisms provide rapid and stringent glucose repression of GAL gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 3834–3841.
- KAKIDANI H., PTASHNE M., 1988 GAL4 activates gene expression in mammalian cells. *Cell* **52**: 161–167.
- KARSI A., MOAV B., HACKETT P., LIU Z., 2001 Effects of insert size on transposition efficiency of the sleeping beauty transposon in mouse cells. *Mar. Biotechnol. (NY)*. **3**: 241–245.

- KAWAKAMI K., 2007 Tol2: a versatile gene transfer vector in vertebrates. *Genome Biol.* **8 Suppl 1**: S7.
- KAWAKAMI K., KOGA A., HORI H., SHIMA A., 1998 Excision of the Tol2 transposable element of the medaka fish, *Oryzias latipes*, in zebrafish, *Danio rerio*. *Gene* **225**: 17–22.
- KEEGAN L., GILL G., PTASHNE M., 1986 Separation of DNA binding from the transcription-activating function of a eukaryotic regulatory protein. *Science* **231**: 699–704.
- KENNEDY M. J., HUGHES R. M., PETEYA L. A., SCHWARTZ J. W., EHLERS M. D., TUCKER C. L., 2010 Rapid blue-light-mediated induction of protein interactions in living cells. *Nat. Methods* **7**: 973–975.
- KHILLAN J. S., OVERBEEK P. A., WESTPHAL H., 1985 *Drosophila* P element integration in the mouse. *Dev. Biol.* **109**: 247–250.
- KIERNAN J. A., 2007 Indigogenic substrates for detection and localization of enzymes. *Biotech. Histochem.* **82**: 73–103.
- KIM Y. G., CHA J., CHANDRASEGARAN S., 1996 Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**: 1156–1160.
- KLAR A. S., HALVORSON H., 1974 Studies on the positive regulatory gene, GAL4, in regulation of galactose catabolic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet. MGG* **135**: 203–212.
- KÖSTER R. W., FRASER S. E., 2001 Tracing transgene expression in living zebrafish embryos. *Dev. Biol.* **233**: 329–346.
- LAI S.-L., LEE T., 2006 Genetic mosaic with dual binary transcriptional systems in *Drosophila*. *Nat. Neurosci.* **9**: 703–709.
- LARSCHAN E., WINSTON F., 2001 The *S. cerevisiae* SAGA complex functions in vivo as a coactivator for transcriptional activation by Gal4. *Genes Dev.* **15**: 1946–1956.
- LEE T., 2014 Generating mosaics for lineage analysis in flies. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* **3**: 69–81.
- LEE T., LUO L., 1999 Mosaic analysis with a repressible cell marker for studies of gene function in neuronal morphogenesis. *Neuron* **22**: 451–461.
- LEE G., SAITO I., 1998 Role of nucleotide sequences of loxP spacer region in Cre-mediated recombination. *Gene* **216**: 55–65.
- LIANG S. D., MARMORSTEIN R., HARRISON S. C., PTASHNE M., 1996 DNA sequence preferences of GAL4 and PPR1: how a subset of Zn₂ Cys₆ binuclear cluster proteins recognizes DNA. *Mol. Cell. Biol.* **16**: 3773–3780.
- LITTLE J. W., MOUNT D. W., YANISCH-PERRON C. R., 1981 Purified lexA protein is a repressor of the recA and lexA genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **78**: 4199–4203.
- LIVET J., WEISSMAN T. A., KANG H., DRAFT R. W., LU J., BENNIS R. A., SANES J. R., LICHTMAN J. W., 2007 Transgenic strategies for combinatorial expression of fluorescent proteins in the nervous system. *Nature* **450**: 56–62.
- LOHR D., VENKOV P., ZLATANOVA J., 1995 Transcriptional regulation in the yeast GAL gene family: a complex genetic network. *FASEB J.* **9**: 777–787.
- LUAN H., PEABODY N. C., VINSON C. R., WHITE B. H., 2006 Refined Spatial Manipulation of Neuronal Function by Combinatorial Restriction of Transgene Expression. *Neuron* **52**: 425–436.
- 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**: 727–742.
- LUNDIN M., NEHLIN J. O., RONNE H., 1994 Importance of a flanking AT-rich region in target site recognition by the GC box-binding zinc finger protein MIG1. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 1979–1985.
- LYND A., LYCETT G. J., 2012 Development of the bi-partite Gal4-UAS system in the African malaria mosquito, *Anopheles gambiae*. *PLoS One* **7**.
- MA J., PRZIBILLA E., HU J., BOGORAD L., PTASHNE M., 1988 Yeast activators stimulate plant gene expression. *Nature* **334**: 631–633.
- MA J., PTASHNE M., 1987a Deletion analysis of GAL4 defines two transcriptional activating segments. *Cell* **48**: 847–853.
- MA J., PTASHNE M., 1987b The carboxy-terminal 30 amino acids of GAL4 are recognized by GAL80. *Cell* **50**: 137–142.
- MAEDER M. L., THIBODEAU-BEGANNY S., OSIAK A., WRIGHT D. A., ANTHONY R. M., EICHTINGER M., JIANG T., FOLEY J. E., WINFREY R. J., TOWNSEND J. A., UNGER-WALLACE E., SANDER J. D., MÜLLER-LERCH F., FU F., PEARLBERG J., GÖBEL C., DASSIE J. P., PRUETT-MILLER S. M., PORTEUS M. H., SGROI D. C., IAFRATE A. J.,

- DOBBS D., MCCRAY P. B., CATHOMEN T., VOYTAS D. F., JOUNG J. K., 2008 Rapid “Open-Source” Engineering of Customized Zinc-Finger Nucleases for Highly Efficient Gene Modification. *Mol. Cell* **31**: 294–301.
- MAJUMDAR S., GHATAK J., MUKHERJI S., BHATTACHARJEE H., BHADURI A., 2004 UDPgalactose 4-epimerase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **271**: 753–759.
- MALDONADO-CODINA G., LLAMAZARES S., GLOVER D. M., 1993 Heat shock results in cell cycle delay and synchronisation of mitotic domains in cellularised *Drosophila melanogaster* embryos. *J. Cell Sci.* **105** (Pt 3: 711–720.
- MALLO M., 2006 Controlled gene activation and inactivation in the mouse. *Front. Biosci.* **11**: 313–327.
- MCGUIRE S. E., LE P. T., OSBORN A. J., MATSUMOTO K., DAVIS R. L., 2003 Spatiotemporal rescue of memory dysfunction in *Drosophila*. *Science* **302**: 1765–1768.
- MELCHER K., XU H. E., 2001 Gal80-Gal80 interaction on adjacent Gal4p binding sites is required for complete GAL gene repression. *EMBO J.* **20**: 841–851.
- MIESENBOCK G., ANGELIS D. A. DE, ROTHMAN J. E., 1998 Visualizing secretion and synaptic transmission with pH-sensitive green fluorescent proteins. *Nature* **394**: 192–195.
- MONDAL K., DASTIDAR A. G., SINGH G., MADHUSUDHANAN S., GANDE S. L., VIJAYRAGHAVAN K., VARADARAJAN R., 2007 Design and Isolation of Temperature-sensitive Mutants of Gal4 in Yeast and *Drosophila*. *J. Mol. Biol.* **370**: 939–950.
- MOUNT S. M., BURKS C., HERTZ G., STORMO G. D., WHITE O., FIELDS C., 1992 Splicing signals in *Drosophila*: intron size, information content, and consensus sequences. *Nucleic Acids Res.* **20**: 4255–4262.
- NAGEL G., SZELLAS T., HUHN W., KATERIYA S., ADEISHVILI N., BERTHOLD P., OLLIG D., HEGEMANN P., BAMBERG E., 2003 Channelrhodopsin-2, a directly light-gated cation-selective membrane channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**: 13940–13945.
- NACHER J. C., AKUTSU T., 2013 Structural controllability of unidirectional bipartite networks. *Sci. Rep.* **3**: 1647.
- NAKAZAWA N., TANIGUCHI K., OKUMURA T., MAEDA R., MATSUNO K., 2012 A novel Cre/loxP system for mosaic gene expression in the *Drosophila* embryo. *Dev. Dyn.* **241**: 965–74.
- NEHLIN J. O., CARLBERG M., RONNE H., 1991 Control of yeast GAL genes by MIG1 repressor: a transcriptional cascade in the glucose response. *EMBO J.* **10**: 3373–3377.
- NEHLIN J. O., RONNE H., 1990 Yeast MIG1 repressor is related to the mammalian early growth response and Wilms’ tumour finger proteins. *EMBO J.* **9**: 2891–2898.
- NELLEN D., BURKE R., STRUHL G., BASLER K., 1996 Direct and Long-Range Action of a DPP Morphogen Gradient. *Cell* **85**: 357–368.
- O’DONNELL K. H., CHEN C. T., WENSINK P. C., 1994 Insulating DNA directs ubiquitous transcription of the *Drosophila melanogaster* alpha 1-tubulin gene. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 6398–6408.
- O’KANE C. J., GEHRING W. J., 1987 Detection in situ of genomic regulatory elements in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**: 9123–9127.
- OGURA E., OKUDA Y., KONDOH H., KAMACHI Y., 2009 Adaptation of GAL4 activators for GAL4 enhancer trapping in zebrafish. *Dev. Dyn.* **238**: 641–655.
- ORNITZ D. M., MOREADITH R. W., LEDER P., 1991 Binary system for regulating transgene expression in mice: targeting int-2 gene expression with yeast GAL4/UAS control elements. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**: 698–702.
- OSTERWALDER T., YOON K. S., WHITE B. H., KESHISHIAN H., 2001 A conditional tissue-specific transgene expression system using inducible GAL4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**: 12596–12601.
- PAN Y. A., FREUNDLICH T., WEISSMAN T. a, SCHOPPIK D., WANG X. C., ZIMMERMAN S., CIRUNA B., SANES J. R., LICHTMAN J. W., SCHIER A. F., 2013 Zebrafish: multispectral cell labeling for cell tracing and lineage analysis in zebrafish. *Development* **140**: 2835–46.
- PATEL V. B., SCHWEIZER M., DYKSTRA C. C., KUSHNER S. R., GILES N. H., 1981 Genetic organization and transcriptional regulation in the qa gene cluster of *Neurospora crassa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **78**: 5783–5787.
- PATTERSON J. T., 1929 The production of mutations in somatic cells of *Drosophila melanogaster* by means of x-rays. *J. Exp. Zool.* **53**: 327–372.
- PAULUS H., 2000 Protein splicing and related forms of protein autoprocessing. *Annu. Rev. Biochem.* **69**: 447–496.
- PETERSEN L. K., STOWERS R. S., 2011 A Gateway Multisite recombination cloning toolkit. *PLoS One* **6**.

- PFEIFFER B. D., JENETT A., HAMMONDS A. S., NGO T.-T. B., MISRA S., MURPHY C., SCULLY A., CARLSON J. W., WAN K. H., LAVERTY T. R., MUNGALL C., SVIRSKAS R., KADONAGA J. T., DOE C. Q., EISEN M. B., CELNIKER S. E., RUBIN G. M., 2008 Tools for neuroanatomy and neurogenetics in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**: 9715–9720.
- PFEIFFER B. D., NGO T.-T. B., HIBBARD K. L., MURPHY C., JENETT A., TRUMAN J. W., RUBIN G. M., 2010 Refinement of tools for targeted gene expression in *Drosophila*. *Genetics* **186**: 735–755.
- PHELPS C. B., BRAND A. H., 1998 Ectopic gene expression in *Drosophila* using GAL4 system. *Methods* **14**: 367–379.
- PIMPINELLI S., RIPOLL P., 1986 Nonrandom segregation of centromeres following mitotic recombination in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **83**: 3900–3903.
- PLAZA S. M., SCHEFFER L. K., CHKLOVSKII D. B., 2014 Toward large-scale connectome reconstructions. *Curr. Opin. Neurobiol.* **25**: 201–210.
- POTTER C. J., TASIC B., RUSSLER E. V., LIANG L., LUO L., 2010 The Q system: A repressible binary system for transgene expression, lineage tracing, and mosaic analysis. *Cell* **141**: 536–548.
- RAMOS J., SZKUTNICKA K., CIRILLO V. P., 1989 Characteristics of galactose transport in *Saccharomyces cerevisiae* cells and reconstituted lipid vesicles. *J. Bacteriol.* **171**: 3539–3544.
- REIFF D. F., IHRING A., GUERRERO G., ISACOFF E. Y., JOESCH M., NAKAI J., BORST A., 2005 In vivo performance of genetically encoded indicators of neural activity in flies. *J. Neurosci.* **25**: 4766–4778.
- REMINGTON S. J., 2006 Fluorescent proteins: maturation, photochemistry and photophysics. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **16**: 714–721.
- RIZZO M. A., SPRINGER G. H., GRANADA B., PISTON D. W., 2004 An improved cyan fluorescent protein variant useful for FRET. *Nat. Biotechnol.* **22**: 445–449.
- RØRTH P., SZABO K., BAILEY A., LAVERTY T., REHM J., RUBIN G. M., WEIGMANN K., MILÁN M., BENES V., ANSORGE W., COHEN S. M., 1998 Systematic gain-of-function genetics in *Drosophila*. *Development* **125**: 1049–1057.
- SADOWSKI I., MA J., TRIEZENBERG S., PTASHNE M., 1988 GAL4-VP16 is an unusually potent transcriptional activator. *Nature* **335**: 563–564.
- SAUER B., 1994 Site-specific recombination: developments and applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* **5**: 521–527.
- SCOTT E. K., MASON L., ARRENBURG A. B., ZIV L., GOSSE N. J., XIAO T., CHI N. C., ASAKAWA K., KAWAKAMI K., BAIER H., 2007 Targeting neural circuitry in zebrafish using GAL4 enhancer trapping. *Nat. Methods* **4**: 323–326.
- SEPP K. J., AULD V. J., 1999 Conversion of lacZ enhancer trap lines to GAL4 lines using targeted transposition in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **151**: 1093–1101.
- SHANER N. C., CAMPBELL R. E., STEINBACH P. A., GIEPMANS B. N. G., PALMER A. E., TSIEN R. Y., 2004 Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* **22**: 1567–1572.
- SHEARIN H. K., DVARISHKIS A. R., KOZELUH C. D., STOWERS R. S., 2013 Expansion of the gateway multisite recombination cloning toolkit. *PLoS One* **8**: e77724.
- SHIMOMURA O., JOHNSON F. H., SAIGA Y., 1962 Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusan, *Aequorea*. *J. Cell. Comp. Physiol.* **59**: 223–239.
- SCHERER N., CAMPOS-ORTEGA J. A., 1999 Use of the Gal4-UAS technique for targeted gene expression in the zebrafish. *Mech. Dev.* **80**: 153–158.
- SCHERER N., GROTH A., HANS S., CAMPOS-ORTEGA J. A., 2001 An instructive function for Notch in promoting gliogenesis in the zebrafish retina. *Development* **128**: 1099–1107.
- SHELL M. A., WILSON D. B., 1977 Purification and properties of galactokinase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **252**: 1162–1166.
- SIEGAL M. L., HARTL D. L., 1996 Transgene Coplacement and high efficiency site-specific recombination with the Cre/loxP system in *Drosophila*. *Genetics* **144**: 715–726.
- SINZELLE L., VALLIN J., COEN L., CHESNEAU A., PASQUIER D. DU, POLLET N., DEMENEIX B., MAZABRAUD A., 2006 Generation of transgenic *Xenopus laevis* using the Sleeping Beauty transposon system. *Transgenic Res.* **15**: 751–760.
- SKARNES W. C., AUERBACH B. A., JOYNER A. L., 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**: 903–918.

- SPRADLING A. C., RUBIN G. M., 1982 Transposition of cloned P elements into *Drosophila* germ line chromosomes. *Science* **218**: 341–347.
- SPRADLING A. C., STERN D. M., KISS I., ROOTE J., LAVERTY T., RUBIN G. M., 1995 Gene disruptions using P transposable elements: an integral component of the *Drosophila* genome project. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**: 10824–10830.
- STEBBINS M. J., URLINGER S., BYRNE G., BELLO B., HILLEN W., YIN J. C., 2001 Tetracycline-inducible systems for *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**: 10775–10780.
- STEBBINS M. J., YIN J. C. P., 2001 Adaptable doxycycline-regulated gene expression systems for *Drosophila*. *Gene* **270**: 103–111.
- STEPHENSON M., YUDKIN J., 1936 Galactozymase considered as an adaptive enzyme. *Biochem. J.* **30**: 506–514.
- STERNBERG N., 1981 Bacteriophage P1 site-specific recombination. *J. Mol. Biol.* **150**: 603–608.
- STRUHL K., 1984 Genetic properties and chromatin structure of the yeast gal regulatory element: an enhancer-like sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **81**: 7865–7869.
- STRUHL G., BASLER K., 1993 Organizing activity of wingless protein in *Drosophila*. *Cell* **72**: 527–540.
- SUN B., XU P., SALVATERRA P. M., 1999 Dynamic visualization of nervous system in live *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**: 10438–10443.
- SUSTER M. L., SEUGNET L., BATE M., SOKOLOWSKI M. B., 2004 Refining GAL4-driven transgene expression in *Drosophila* with a GAL80 enhancer-trap. *Genesis* **39**: 240–245.
- SWEENEY S. T., BROADIE K., KEANE J., NIEMANN H., O’KANE C. J., 1995 Targeted expression of tetanus toxin light chain in *Drosophila* specifically eliminates synaptic transmission and causes behavioral defects. *Neuron* **14**: 341–351.
- SZÜTS D., BIENZ M., 2000 LexA chimeras reveal the function of *Drosophila* Fos as a context-dependent transcriptional activator. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**: 5351–5356.
- TANG X., DONG W., GRIFFITH J., NILSEN R., MATTHES A., CHENG K. B., REEVES J., SCHUTTLER H. B., CASE M. E., ARNOLD J., LOGAN D. A., 2011 Systems biology of the qa gene cluster in *Neurospora crassa*. *PLoS One* **6**.
- TANIGUCHI K., MAEDA R., ANDO T., OKUMURA T., NAKAZAWA N., HATORI R., NAKAMURA M., HOZUMI S., FUJIWARA H., MATSUNO K., 2011 Chirality in planar cell shape contributes to left-right asymmetric epithelial morphogenesis. *Science* **333**: 339–341.
- TEH C., CHUDAKOV D. M., POON K.-L., MAMEDOV I. Z., SEK J.-Y., SHIDLOVSKY K., LUKYANOV S., KORZH V., 2010 Optogenetic in vivo cell manipulation in KillerRed-expressing zebrafish transgenics. *BMC Dev. Biol.* **10**: 110.
- THEODOSIOU N. A., XU T., 1998 Use of FLP/FRT system to study *Drosophila* development. *Methods* **14**: 355–365.
- TING C.-Y., GU S., GUTTIKONDA S., LIN T.-Y., WHITE B. H., LEE C.-H., 2011 Focusing transgene expression in *Drosophila* by coupling Gal4 with a novel split-LexA expression system. *Genetics* **188**: 229–233.
- TSCHOPP J. F., EMR S. D., FIELD C., SCHEKMAN R., 1986 GAL2 codes for a membrane-bound subunit of the galactose permease in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **166**: 313–318.
- URLINGER S., BARON U., THELLMANN M., HASAN M. T., BUJARD H., HILLEN W., 2000 Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**: 7963–7968.
- VALLE RODRÍGUEZ A. DEL, DIDIANO D., DESPLAN C., 2011 Power tools for gene expression and clonal analysis in *Drosophila*. *Nat. Methods* **9**: 47–55.
- VENKEN K. J. T., BELLEN H. J., 2007 Transgenesis upgrades for *Drosophila melanogaster*. *Development* **134**: 3571–3584.
- VIT M. J. DE, WADDLE J. A., JOHNSTON M., 1997 Regulated nuclear translocation of the Mig1 glucose repressor. *Mol. Biol. Cell* **8**: 1603–1618.
- VOZIYANOV Y., KONIECZKA J. H., STEWART A. F., JAYARAM M., 2003 Stepwise manipulation of DNA specificity in Flp recombinase: Progressively adapting Flp to individual and combinatorial mutations in its target site. *J. Mol. Biol.* **326**: 65–76.
- WANG Y., O’MALLEY B. W., TSAI S. Y., 1994 A regulatory system for use in gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**: 8180–8184.
- WEBSTER N., JIN J. R., GREEN S., HOLLIS M., CHAMBON P., 1988 The yeast UASG is a transcriptional enhancer in human HeLa cells in the presence of the GAL4 trans-activator. *Cell* **52**: 169–178.

- WELMAN A., BARRACLOUGH J., DIVE C., 2007 Tetracycline regulated systems in functional oncogenomics. *Transl. Oncogenomics* **2**: 17–33.
- WERTMAN K. F., MOUNT D. W., 1985 Nucleotide sequence binding specificity of the LexA repressor of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **163**: 376–384.
- WHITE K., TAHAOGLU E., STELLER H., 1996 Cell killing by the *Drosophila* gene reaper. *Science* **271**: 805–807.
- WONG L.-J., FREY P. A., 1974 Galactose-1-phosphate uridylyltransferase. Rate studies confirming a uridylyl-enzyme intermediate on the catalytic pathway. *Biochemistry* **13**: 3889–3894.
- WU Y., REECE R. J., PTASHNE M., 1996 Quantitation of putative activator-target affinities predicts transcriptional activating potentials. *EMBO J.* **15**: 3951–3963.
- XIONG F., WEI Z.-Q., ZHU Z.-Y., SUN Y.-H., 2013 Targeted expression in zebrafish primordial germ cells by Cre/loxP and Gal4/UAS systems. *Mar. Biotechnol. (NY)*. **15**: 526–39.
- XU T., RUBIN G. M., 1993 Analysis of genetic mosaics in developing and adult *Drosophila* tissues. *Development* **117**: 1223–1237.
- YEH E., GUSTAFSON K., BOULIANNE G. L., 1995 Green fluorescent protein as a vital marker and reporter of gene expression in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**: 7036–7040.
- YU H.-H., CHEN C.-H., SHI L., HUANG Y., LEE T., 2009 Twin-spot MARCM to reveal the developmental origin and identity of neurons. *Nat. Neurosci.* **12**: 947–953.
- ZEIDLER M. P., TAN C., BELLAICHE Y., CHERRY S., HÄDER S., GAYKO U., PERRIMON N., 2004 Temperature-sensitive control of protein activity by conditionally splicing inteins. *Nat. Biotechnol.* **22**: 871–876.
- ZHAN H., GONG Z., 2010 Delayed and restricted expression of UAS-regulated GFP gene in early transgenic zebrafish embryos by using the GAL4/UAS system. *Mar. Biotechnol. (NY)*. **12**: 1–7.
- ZHOU X., VINK M., KLAVER B., BERKHOUT B., DAS A. T., 2006 Optimization of the Tet-On system for regulated gene expression through viral evolution. *Gene Ther.* **13**: 1382–1390.