

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Gabriela Příbáňová

Indukovatelné promotory a jejich využití pro buněčné manipulace kvasinek

Inducible promoters and their use in cell yeast manipulation

Bakalářská práce

Školitel: prof. RNDr. Zdena Palková, CSc.

Praha, 2018

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala 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, 10.5. 2017

.....
Gabriela Příbáňová

Poděkování:

Ráda bych poděkovala své školitelce prof. RNDr. Zdeně Palkové, CSc. za podporu, trpělivost, čas i cenné rady. Chtěla bych též poděkovat RNDr. Libuši Váchové, CSc., která se na této práci podílela jako konzultantka. Děkuji Mark Sixmith, B.Sc. za opravu anglické verze abstraktu. Nakonec bych ráda poděkovala své rodině i přátelům za podporu.

Abstrakt

Pro některé buněčné manipulace se dnes využívají promotory, které mohou být indukovány chemickými, nebo určitými fyzikálními faktory. Největší důraz je v této práci kladen na promotory indukovatelné světlem. Jsou dva přístupy, které nám umožňují aktivaci promotoru působením světla. První z nich využívá tzv. „caged molecules“, chemických induktorů, jejichž regulační aktivita je „maskovaná“ fotolabilní chránicí skupinou. Druhý přístup zahrnuje optogenetické systémy, které mohou v buňkách regulovat transkripci. Tyto systémy jsou kódovány v DNA organismu, který tento systém nese, a jako jediný vnější regulační stimul potřebují světlo. Základní součástí optogenetických aparátů jsou fotoreceptory, které pro svou funkci potřebují kofaktor – chromofor. Fotoreceptory se řadí do několika funkčních skupin podle typu chromoforu a způsobu jejich fotoaktivace. Tato práce dává přehled o optogenetických systémech, využitých pro regulaci transkripce z hlediska využitého fotoreceptoru a mechanismu indukce. Stejně tak se zabývá využitím „caged molecules“ pro regulaci transkripce. Dále jsou zde jmenovány případy využití těchto systémů v kvasinkách, modelového organismu využívaného ve vědě a pro biotechnologické účely. Na závěr diskutuji určitá omezení, které promotory indukovatelné světlem v některých případech disponují, mezi něž patří typ chromoforu, vlnová délka používaného světla či efektivita samotného systému.

Klíčová slova: optogenetika, induktor, promotor, kvasinky, fotoaktivace, světlo

Abstract

Promoters which can be regulated by different chemical or physical factors are often used in cell manipulations. This thesis focuses predominantly on promoter systems which use light as an inductor. There are two main approaches to controlling a promoter by light. The first one uses so-called „caged molecules“, chemical inducers whose inducing activity is „masked“ by a photolabile protecting group. The second approach includes optogenetic systems, which can regulate transcription in cells. These systems are encoded in the DNA of the organism, and light is the only external regulatory stimulus. Photoreceptors that need a specific cofactor (chromophore) are the main components of optogenetic systems. There are several groups of photoreceptors classified by the type of chromophore and photoactivation mechanism. This thesis gives an overview of optogenetic systems used for transcription regulation and focuses on different photoreceptors and induction mechanism used. The systems using photocaged molecules are described as well. Furthermore, the thesis deals with light-systems in yeast as a model organism as well as organism used for biotechnological purposes. Finally, some limitations of light inducible promoters are discussed, including the chromophore type, the wavelength of the light, and the efficiency of the particular system.

Key words: optogenetics, inductor, promoter, yeast, fotoactivation, light

Seznam zkratk

AD - aktivační doména
ADH2 - alkohol dehydrogenáza u kvasinek
AdoB12 - 5' deoxyadenosylkobalamin
AsLOV2 - LOV domána pocházející z *Avena sativa*
BCI - "Brain Computer Interface", nástroj snímající mozkovou aktivitu
BD - "Binding Domain", vazebná doména
BLUF - "senzor for Blue-Light Using FAD", fotoreceptorová doména
BP - "Binding Protein", vazebný protein
BphG1 - bakteriální fytochrom
BphP1 - bakteriální fytochrom
cAMP - cyklický adenosin monofosfát
CarH - represor
CarO - operátorová sekvence
Cas9 - nukleáza
CcaR - transaktivátor
CcaS - fytochrom
c-di-GMP - diguanosin monofosfát
CIB1, CIBN - "Cryptochrome-Interacting Basic-helix-loop-helix", vazebný partner CRY2
COP1 - gen u kvasinek
COP1 - vazebný partner UVR8
Cph1 - bakteriální fytochrom
Cre - rekombináza
CREB - transkripční faktor
Cre-ER - rekombináza, aktivovatelná tamoxifenem
CRISPR/Cas9 - nástroj pro editaci DNA
CRY2 - kryptochrom
DMNT-EDTA - chelatační činidlo, využívané pro maskování měďnatých kationtů
DNA - deoxyribonukleová kyselina
EL222 - fotoaktivovatelný bakteriální transkripční faktor
Env1 - bakteriální histidin kinázová doména
ER - estrogenový receptor
FAD - flavinadenindinukleotid
FHL - vazebný partner PhyA
FHY1 - vazebný partner fytochromu PhyA
FixJ - transkripční faktor
FKF1 - receptor modrého světla, obsahující LOV doménu
FLARE - "Fast Light and Activity-Regulated Expression", transkripční systém využívající světlo a vápník

FMN - flavinmononukleotid
FUN-LOV - "Fungus LOV Domains", transkripční systém aktivovatelný světlem
GAD - aktivační doména transkripčního aktivátoru GAL4
GAL1, GAL10, GAL7 - geny galaktózového metabolismu v kvasinkách
Gal4p - transkripční aktivátor, regulující transkripci galaktózových genů u kvasinek
Gal80p - inhibitor GAL4
Gaq - typ G proteinu
GFP - "Green Fluorescent Protein", zelený fluorescenční protein
GI - "GIGANTEA", vazebný partner FKF1
HSP - "Heat Shock Protein", v tomto případě se váže na ER
HTH - "Helix-Turn-Helix" vazebná doména
ipRGC - „Intrinsically Photosensitive Retinal Ganglion Cells“, světločivné buňky v oku
IPTG - isopropyl-β-galatosid
LACE - „Light Activated CRISPR/Cas9 Effector“, transkripční systém aktivovatelný světlem
LacZ - gen, kódující beta-galaktosidázu
LexA - vazebná doména
LINuS - světlem indukované jaderné lokalizační signály
LITEs - „Light Inducible Transcriptional Effectors“, transkripční systém aktivovatelný světlem
LITEZ - „Light Engineered Zinc finger proteins“, transkripční systém aktivovatelný světlem
LOV - "Light Oxygene or Voltage", fotoreceptorová doména
LoxP – sekvence DNA, umožňující rekombinaci pomocí Cre rekombinázy
NFAT - "Nuclear Factor of Activated T-cells", transkripční faktor
NIR - "Near Infra Red", blízké infračervené světlo
NLS - "Nuclear Localization Signal"
nMag - "Negative Magnet", protein obsahující LOV doménu
OmpR - bakteriální transkripční faktor
opto-DN-CREB - světlem regulovatelný inhibitor transkripčního faktoru CREB
p65 - transaktivační doména
paCas9 - fotoaktivovatelná verze Cas9 nukleázy
PA-Cre - fotoaktivovatelná Cre rekombináza
PAS - "Per-ARNT-Sim", velká skupina senzorových domén
pB - "Phytochrome Blue", stav xanthopsinu
PCB - fytokyanobilin
P_{opcG2} – indukovatelný promotor, využívaný u některých systémů pro zelené světlo
Pfr - "Photoreceptor Far Red", stav molekuly fytochromu
Pg - "Phytochrome Green", stav fytochromu, či též "Phytochrome Ground", stav xanthopsinu
PhiReX - transkripční systém aktivovatelný světlem
PHO5 - kyselá fosfatáza u kvasinek

P_{hsp60} – teplem indukovatelný promotor u kvasinek
PhyA - fytochrom
PhyB – rostlinný fytochrom
PIF6 - "Phytochrome Interacting Partner", vazebný partner PhyB
PKC - fosfokináza C
PLC - fosfolipáza C
pMag - "Positive Magnet", protein obsahující LOV doménu
PpsR2 - vazebný partner BphP1
Pr - "Photoreceptor Red", stav molekuly fytochromu
PR - "Photoreceptor", fotoreceptor
PYP - "Photoactive Yellow Protein", xanthopsinový fotoreceptor
RNA - ribonukleová kyselina
rTNA - transferová RNA
S-gal - 3,4-cyklohexenoeskuletin β -D-galaktopyranosid
sgRNA - "Single Guide RNA"
synTALE - „Synthetic Transcription Activator Like Effectors“, transkripční systém aktivovatelný světlem
T7_{NT}, T7_{CT} - N-koncový a C-koncový zbytek polymerázy z T7 bakteriofága
T7RNAP - RNA polymeráza pocházející z bakteriofága T7
TAG - stopkodón, či triplet, kódující tRNA pyrrolysinu
TALE - vazebná doména
TetO - gen pod promotorem, indukovatelným tetracyklinem
TetR - tetracyklinový represor
TF - transkripční faktor
UAS - "Upstream Regulation Sequence"
UV - ultrafialové světlo
UV-B - ultrafialové světlo vlnové délky 280 nm - 320 nm
UV-B - ultrafialové světlo vlnové délky 320 nm - 400 nm
UVR8 - fotoreceptor UV světla
VP16 - transaktivační doména virového původu
VVD - "VIVID", protein obsahující LOV doménu
WC-1 - "White Collar" fotoreceptor a vazebný partner VVD
YF1 - chimerní kináza, inhibovatelná světlem

Obsah

1	Úvod	1
2	Varianty indukovatelných promotorů.....	3
2.1	Promotory indukovatelné chemicky	3
2.2	Promotory indukovatelné fyzikálními faktory	4
2.2.1	Promotory indukovatelné teplotou	4
2.2.2	Alternativní fyzikální přístupy	5
2.2.3	Promotory indukovatelné světlem a optogenetika.....	5
3	Systémy regulované světlem	6
3.1	Mechanismus fotoaktivace	6
3.2	Obecné principy regulace transkripce pomocí světla	6
3.3	Systémy využívající červené či blízké infračervené světlo	8
3.4	Zelené systémy	11
3.5	Modré systémy	11
3.5.1	Fototropinové systémy	11
3.5.2	CRY domény	17
3.5.3	Xantopsinové systémy	18
3.5.4	Rhodopsinové systémy	19
3.5.5	BLUF domény	20
3.6	UV světlo v optogenetice	20
3.7	„Caged molecules“, systémy s maskovanými molekulami	20
3.8	Světlem indukovatelné promotory u kvasinek	21
3.8.1	Červené systémy u kvasinek	22
3.8.2	Modré systémy u kvasinek - fototropiny	23
3.8.3	Modré systémy u kvasinek - kryptochromy	23
3.8.4	„Caged molecules“ u kvasinek	23
3.9	Omezení systémů, regulujících expresi pomocí světla.....	25
3.9.1	Omezení optogenetických systémů	25
3.9.2	Omezení u „caged molecules“	27
4	Závěr.....	28
5	Seznam použité literatury	29

1 Úvod

Existuje několik úrovní, na kterých lze genovou expresi regulovat, avšak nejvíce úsporná, proto také nejhojněji využívaná, je regulace genové exprese na úrovni iniciace transkripce. Transkripce se zahajuje v oblasti promotoru. Je to regulační oblast DNA, na kterou se váží transkripční faktory s aktivačními doménami, díky kterým může nasednout RNA polymeráza a transkripce může být zahájena. V případě kvasinek a eukaryotních organismů obecně je potřeba nasednutí několika obecných transkripčních faktorů v oblasti core promotoru, která určuje, odkud a kterým směrem bude probíhat transkripce. Jsou zde však další regulační sekvence (ať již upstream či downstream), na které se opět mohou vázat některé regulační proteiny, které dále ovlivňují, jakou měrou bude transkripce probíhat. Síla promotoru se tedy odvíjí nejen od samotné core promotorové sekvence, ale i počtu a umístění regulačních sekvencí. Mimo to závisí i na dostupnosti promotorových a regulačních sekvencí v rámci chromatinu (Alberts 2008*). Indukovatelným promotorem myslíme takový promotor, který obsahuje sekvence, jež mohou vázat regulační proteiny, které transkripci z daného promotoru výrazně ovlivňují (Da Silva a Srikrishnan 2012*). Mezi regulačními proteiny můžeme najít aktivátory či represory. Záleží vždy na kontextu a spolupráci dalších transkripčních regulátorů, jestli se daný regulační protein bude chovat jako aktivátor, nebo represor (Alberts 2008*).

O tom, jestli se bude daný regulátor vázat na příslušné regulační sekvence, rozhoduje afinita DNA vazebné domény regulačního proteinu k příslušné sekvenci. Ta může být dána samotnou sekvencí, z které se odvíjí prostorové uspořádání regulačního proteinu, ale může být dále ovlivněna navázáním nějakého induktoru (případ pozitivní regulace), popř. inhibitoru (negativní regulace). Jejich působením dochází ke konformační změně proteinového regulátoru a tím i změně schopnosti vázat DNA a regulovat transkripci. Induktor může indukovat expresi díky navázání aktivátoru či vyvázáním represoru, inhibitor naopak inhibuje transkripci vyvázáním aktivátoru či umožněním nasednutí represoru. Pomocí těchto mechanismů je možné kontrolovat genovou expresi a určovat tak množství vyrobeného produktu (Alberts 2008*).

Chceme-li v kvasince exprimovat protein našeho zájmu, je vždy nutné najít i vhodný promotor, za který umístíme gen našeho zájmu, abychom zajistili jeho transkripci. V dnešní době je zmapováno jak velké množství promotorů zajišťujících konstantní transkripční aktivitu, ve větší míře nezávislou na vnějších podmínkách, tak promotorů indukovatelných (Da Silva a Srikrishnan 2012*). Ty mohou být regulované různými mechanismy (viz. 2. kapitola). Indukovatelný promotor může ke své aktivitě využívat přirozený regulační aparát buňky (Johnston 1987*). Existují však i systémy, u kterých části nebo celé promotorové sekvence a proteinové regulátory pochází z jiných druhů organismů a jsou vhodně kombinovány tak, aby jako celek byly schopné regulace exprese daného genu (Da Silva a Srikrishnan 2012*). Chceme-li tedy měnit sílu samotného promotoru, je možné to zařídit na úrovni jeho sekvence a sekvence nebo počtu regulačních cis-elementů (Blazek a Alper 2013*), nebo vhodným zásahem do struktury proteinových transkripčních regulátorů (Pathak a kol. 2017). Příklady

jednotlivých součástí transkripčního systému, které se využívají pro jeho vytvoření, jsou např. samotné core sekvence určitého promotoru (Blazec a Alper 2013*), regulační sekvence jako jsou UAS („Upstream Regulation Sequence“) galaktózových genů v kvasinkách (West a kol. 1987), DNA vazebné domény jako jsou Gal4p (Sadowski a kol. 1988) nebo LexA (Brent a Ptashne 1985), a nakonec aktivační domény jako je třeba VP16 (Sadowski a kol. 1988, 16).

Výhodou indukovatelných promotorů je, že mohou být ovlivnitelné z hlediska síly indukce (tedy i následné exprese), nebo času, kdy jsou aktivovány, popř. jak dlouho jsou aktivovány. Jejich využití je například výhodné, pokud je naším zájmem exprimovat gen, který pro využívaný organismus představuje nějakou zátěž. Ideální indukovatelný promotor tvoří minimální pozadí ve své neaktivované formě a je citlivý ke svému induktoru. Prodloužením mezi zpřístupněním induktoru buňkám a začátkem transkripce by měla být co nejkratší. V ideálním případě by systém měl být schopný flexibilně přecházet z neaktivního stavu do aktivního a naopak, podobně jako spínač. Induktor sám by neměl ovlivňovat další biologické procesy v buňce a její životaschopnost obecně, měl by se dát rovnoměrně rozdělit mezi buněčnou masu a v ideálním případě by ani neměl být příliš drahý (Da Silva a Srikrishnan 2012*; Motta-Mena a kol. 2014*). Tyto představy o dokonalém indukovatelném promotoru však ne všechny popsané či vyvinuté systémy vykazují, nicméně v dnešní době jich existuje velké množství a pro různé studie mohou být vhodné i různorodé přístupy z hlediska regulace iniciace transkripce.

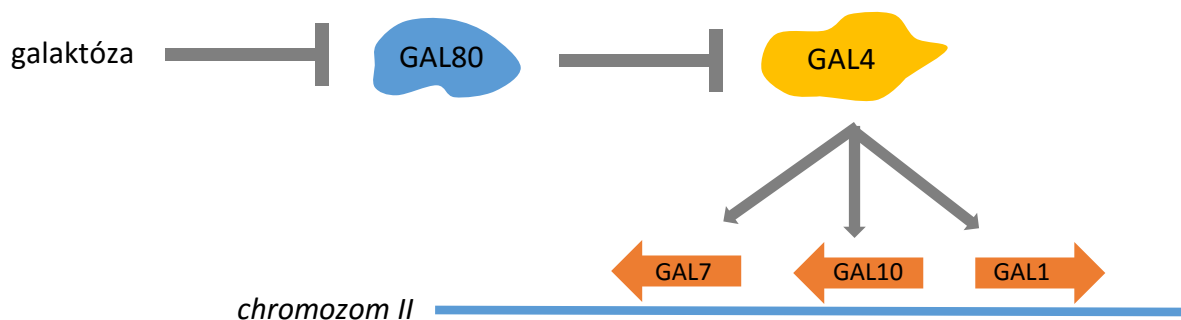
Cílem této práce je nastínit současné možnosti regulace transkripce, využitelné zejména u kvasinek. Důraz je kladen na systémy využívající pro svou regulaci světlo. Převážná část práce je proto věnovaná principům indukce transkripce pomocí světla a podrobně se zabývá jednotlivými systémy, které byly využity pro světlem regulovanou transkripci. Práce taktéž shrnuje přístupy indukce transkripce pomocí světla, které byly doposud využity u kvasinek.

2 Varianty indukovatelných promotorů

Indukovatelných promotorů je všeobecně známo velké množství, mimo kvasinek i u řady dalších organismů. Tato kapitola se proto omezuje jen na nejznámější zástupce těchto systémů a jejím cílem je popsat možnosti indukce transkripce, které se odvíjí od povahy induktoru.

2.1 Promotory indukovatelné chemicky

Indukce exprese pomocí chemických induktorů je v současnosti asi nejvyužívanější přístup. Vzhledem k tomu, že je takových systémů velmi mnoho, omezím se pouze na určité zástupné příklady u kvasinek. Typickým příkladem chemicky indukovatelných promotorů jsou promotory genů metabolismu galaktózy *GAL1*, *GAL10* a *GAL7* (St John a Davis 1981; Douglas a Hawthorne 1964). Transkripce z těchto promotorů je aktivována v přítomnosti galaktózy, naopak přítomnost glukózy ji inhibuje (Adams 1972). Systém pro regulaci těchto genů zahrnuje dva regulátory, transkripční aktivátor Gal4p a jeho inhibitor Gal80p. Induktor – galaktóza, se váže na Gal80p, což potlačí jeho inhibiční aktivitu vůči Gal4p. Díky tomu nic nebrání Gal4p v zahájení transkripce vazbou na regulační sekvence (obr. 1) (Johnston 1987*).



Obr. 1: Indukce exprese pomocí galaktózy. Galaktóza brání vazbě GAL80 na transkripční faktor GAL4, který následně může aktivovat transkripci genů *GAL1*, *GAL10* a *GAL7*. Schéma vytvořeno podle (Johnston 1987).

Jako induktory chemické povahy se využívají i měďnaté kationty, pro které se využívá promotor genu *COPI* (Etcheverry 1990*; Labbé a Thiele 1999*). U methylotrofních kvasinek (např. *Pichia pastoris*), schopných metabolizovat methanol, se zase využívá silný promotoru genu *AOXI* (alkohol oxidáza 1). Je indukovatelný methanolem a inhibovatelný přítomností glukózy a ethanolu (Cregg a kol. 1985).

U kvasinek se také využívají inhibovatelné promotory. Mezi ně patří promotor genu alkohol dehydrogenázy, který je aktivní za nepřítomnosti glukózy (*ADH2*) (Price 1997), promotor genu kyselé fosfatázy (*PHO5*) aktivní v nepřítomnosti fosfátu (Tait-Kamradt a kol. 1986; Dehoux a kol. 1986), nebo promotor O-acetyl homoserin sulfhydrolázy (*MET25*) aktivní v nepřítomnosti methioninu či S-adenosymethioninu (Thomas, Cherest, a Surdin-Kerjan 1989; Solow, Sengbusch, a Laird 2005).

Používáme-li přirozeného regulačního aparátu kvasinky pro heterologní transkripci, je žádoucí, aby zásahy, kterými regulujeme transkripci daného genu nezasahovaly do přirozených regulací buňky a naopak. Jinými slovy, aparát, který reguluje transkripci přirozených genů by neměl být ten samý, kterým regulujeme expresi heterologního genu. Proto se těchto případech používají kmeny, u kterých jsou geny pro daný regulační aparát deletované (Hughes a kol. 2012). Jinou variantou je použití heterologních promotorových systémů, jejichž induktory v kvasinkových buňkách neovlivňují transkripci žádného genu. Takové systémy mohou využívat jako induktor např. β -estradiol (Louvion, Havaux-Copf, a Picard 1993; Ottoz, Rudolf, a Stelling 2014) nebo isopropyl- β -thio-galaktosid (IPTG) (Kjaerulff a Nielsen 2015). Jiný přístup využívá potlačení exprese pomocí doxycyklinu (Yen a kol. 2003). Tyto systémy mimo jiné byly upraveny tak, aby mohly být regulovány pomocí světla, jejich princip bude blíže objasněn v kapitole 3.8.

I přes svou rozšířenost mají chemicky regulovatelné promotory řadu dalších nevýhod (pro zjednodušení budu psát o indukci, ačkoliv tyto případy platí i pro inhibici). Jedním z nich je možnost pouze jednosměrné indukce. Pokud jednou dodáme induktor, je velmi obtížné jej z média zase odebrat (Müller a kol. 2015*). Výjimku mohou představovat případy, kdy je induktor zároveň v buňce metabolizován, takže by se po nějaké době mohl opět uvolnit prostor pro nový běh indukce (Kusen a kol. 2016). Chování chemického induktoru je do velké míry ovlivněno difuzí, což opět může představovat problém v řadě situací. Látka se nemusí do všech míst biologického systému dostat stejně rychle a ve stejné dávce, což zhoršuje možnosti regulace exprese v rámci času, prostoru i míry odpovědi (Müller a kol. 2015*). V neposlední řadě, ve velkých množstvích mohou být některé induktory pro organismy škodlivé a jejich použití drahé (hlavně při biotechnologických aplikacích) (Salinas a kol. 2017*).

2.2 Promotory indukovatelné fyzikálními faktory

Organismy může ohrozit i řada fyzikálních faktorů vnějšího okolí, proto i pro ně v buňkách existují regulační mechanismy, které se odrážejí na charakteru genové exprese, čehož mnoho umělých systémů využívá.

2.2.1 Promotory indukovatelné teplotou

Další možností pro indukci exprese je využití zvýšené teploty (Suzuki a kol. 2006). Teplota je induktor levný a velmi dobře proniká do buněčných struktur, je uplatnitelný i pro terapeutické účely (Huang a kol. 2000). U kvasinek *Schizosaccharomyces pombe* byl popsán teplem indukovatelný promotor P_{hsp16} . Již při teplotě 36°C reportérový gen vykazoval nárůst exprese, při 42°C byla jeho produkce maximální (Fujita a kol. 2006).

V kombinaci s teplem indukovatelnými promotory se nachází zajímavá možnost využití ultrazvuku, který umožňuje cílit tvorbu tepla na konkrétní oblast v buněčné populaci (velikost 10-100 mm³) a

indukovat tak expresi pouze v jeho vybrané části (Plathow a kol. 2005). Zvukové vlny vysoké frekvence napomáhají transfekci cizorodé DNA do buněk a mohou indukovat expresi u promotorů indukovatelných teplem (Huber a kol. 2003).

Další zajímavý přístup spočívá ve využití magnetických nanočástic pro generování tepla v buňkách tkání pomocí měnícího se magnetického pole. Tato metoda opět využívá teplem indukovatelných promotorů v buňkách, tentokrát jsou však aktivovány teplem generovaným pohybem nanočástic v důsledku působení magnetického pole. (Ortner a kol. 2012)

Zřejmou nevýhodou těchto systémů je nebezpečí působení tepelného stresu, což má za následek zvýšení ROS (Morano, Grant, a Moye-Rowley 2012*).

2.2.2 Alternativní fyzikální přístupy

Je mnoho dalších fyzikálních faktorů, které mohou regulovat genovou expresi, jako je například velký osmotický tlak (Martínez-Montañés a kol. 2013), elektrický proud (Rubenstrunk a kol. 2005), nebo nedostatek kyslíku (T. Liu a kol. 2005).

Tyto faktory však často představují pro organismus určitou zátěž, což se může projevit na fyziologii daného organismu (Chowdhury, Smith, a Gustin 1992; Rubenstrunk a kol. 2005; Trendelewa, Aliverdieva, a Zvyagilskaya 2014*). Působení oxidativního stresu může například omezit celkově výkonnost transkripce (Shenton a kol. 2006) a proteosyntézy (Shenton a Grant 2003).

U kvasinek se můžeme setkat s upraveným promotorem, který spouští transkripci určitých genů při nízkém pH okolního prostředí. Byl odvozen od přirozeného kvasinkového promotoru a k němu byly přidány vazebné sekvence pro aktivátory, které se vázaly zejména při nízkém pH. Kromě pH mají na aktivitu tohoto promotoru vliv také oxidativní a osmotický stres (Rajkumar a kol. 2016). Tento promotor proto může být účinný při pěstování kvasinek v suboptimálních podmínkách, avšak přesná regulace exprese vzhledem k dalším faktorům, které ji ovlivňují, je v tomto případě problematická.

2.2.3 Promotory indukovatelné světlem a optogenetika

V poslední době se rozšiřuje využití světla pro kontrolu mnoha buněčných procesů, od meziproteinových interakcí (Taslimi a kol. 2014), signálních drah (Stewart-Ornstein a kol. 2017), přes cílení proteinů do určitých buněčných struktur (Yang a kol. 2013) až právě po regulaci exprese (viz. kapitola *Systémy regulované světlem*). Na velkém vzestupu je obor zvaný optogenetika, která kombinuje využití světla s vhodnými proteinovými efekty, které si buňka dokáže sama vyrábět. Velmi atraktivním rysem stále více populární optogenetiky je možnost kontrolovat řadu biologických procesů pouze působením světla (Miesenböck 2009*). Kromě optogenetiky se nabízí využití maskovaných induktorů, které taktéž mohou být využity pro řízení určitých biologických funkcí pomocí světla (Kusen a kol. 2016).

Využití světla přináší mnohé výhody. Můžeme velmi dobře kontrolovat délku časového působení induktoru, stejně jako jeho intenzitu a je možné vymezit oblasti, které budou induktoru vystaveny (Gautier a kol. 2014*). Další nespornou výhodou je možnost působit do hloubky i bez nutnosti narušení integrity vzájemného buněčného (Miesenböck 2009) či kultivačního uspořádání, jsou proto vhodné např. pro anaerobní kultivaci (Binder a kol. 2016*). Induktor není omezen difuzí (Müller a kol. 2015*) a je možné využít i více promotorů regulovatelných světlem pro expresi několika různých genů najednou, pokud každý z jejich promotorů bude indukovatelný jinou vlnovou délkou (J. J. Tabor, Levskaya, a Voigt 2011; Müller, Engesser, Schulz, a kol. 2013) Využití světla pro indukci exprese, a to zejména v kvasinkách, je hlavním tématem této práce a je diskutováno v dalších kapitolách.

3 Systémy regulované světlem

3.1 *Mechanismus fotoaktivace*

Reakce molekuly na světlo může být dvojího typu, vratná a nevratná. Jsou molekuly, které působením světla vytvoří stabilní produkt. Taková fotoaktivace molekuly je nevratná a tyto fotolabilní molekuly jsou využívány pro tvorbu tzv. „caged molecules“ (Gautier a kol. 2014*).

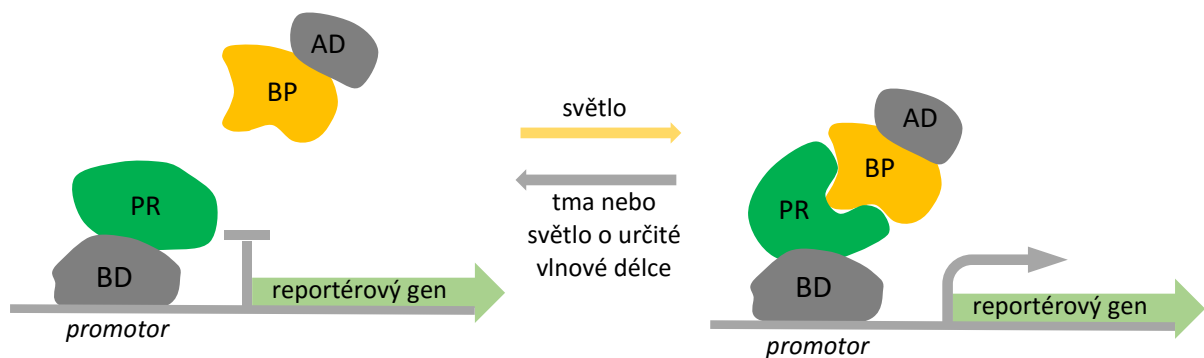
Molekuly, u nichž je reakce na světlo vratná, jsou např. fotoreceptory. Ty mohou přecházet mezi dvěma stavy opakovaně (Gautier a kol. 2014*). Mezi ně patří kryptochromy (Kochhar, Kochhar, a Mohr 1981), fytochromy (Borthwick a Cathey 1962), fototropiny (Freddolino, Gardner, a Schulten 2013), rhodopsiny (Bliss 1946), receptory UV světla (Jenkins 2014), proteiny s BLUF doménou (Iseki a kol. 2002), xantopsiny (Kort a kol. 1996) a fotoreceptory, využívající 5' deoxyadenosylkobalamin jako chromofor (Kutta a kol. 2015). Součástí fotoreceptoru je polypeptid a jeho kofaktor, chromofor. Chromofor dokáže pohltit určité kvantum světelné energie, foton (Gautier a kol. 2014*). Tato energie umožní molekule chromoforu změnit konformaci z cis na trans, přemístit elektron či proton, nebo vytvořit novou kovalentní vazbu (Michael A. van der Horst a Hellingwerf 2004*). Relativně malá změna chromoforu se projeví na prostorovém uspořádání celého peptidu (Gautier a kol. 2014*), a umožní mu např. vazbu s jiným proteinem (Shimizu-Sato a kol. 2002), nebo umožní určitou enzymatickou aktivitu (Zhang a kol. 2011). Kvantum světelné energie potřebné k této změně není náhodné, fotoreceptory reagují jen na fotony určitých vlnových délek (Michael A. van der Horst a Hellingwerf 2004*). Aktivovaný stav není dlouhodobě stabilní a aktivovaný fotoreceptor se může vrátit do svého základního stavu samovolně (Gautier a kol. 2014*). V některých případech je možné tento proces urychlit opět světlem o určité vlnové délce (Smith a Holmes 1977).

3.2 *Obecné principy regulace transkripce pomocí světla*

Existuje mnoho druhů nástrojů a systémů, které umožňují organismům reagovat na světlo. Známe řadu fotoreceptorů a fotoreaktivních molekul u bakterií (Losi a kol. 2002), rostlin (Sharrock a Quail 1989),

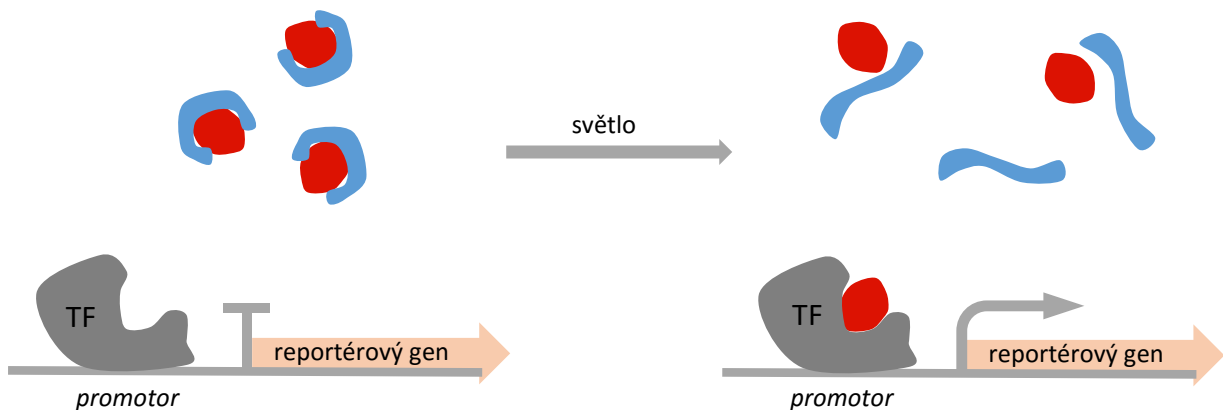
hub (Froehlich a kol. 2002) a živočichů (Provencio a kol. 1998). Jejich funkce v původním organismu zahrnují kontrolu cirkadiálního rytmu (Komada a kol. 2015), fototropismus u rostlin (Christie a kol. 1999) či fototaxi (Chau, Bhaya, a Huang 2017). Některé z těchto fotoreaktivních molekul byly použity pro vytvoření umělých, světlem indukovatelných promotorů, které umožňují transkripci heterologního proteinu. Níže v jednotlivých podkapitolách jsou tyto systémy, využití u různých druhů organismů, uvedeny. Přehled optogenetických systémů uvádí *Tab. 1*.

Pokud budeme chtít genovou expresi nějakým způsobem řídit působením světla, nabízí se nám několik přístupů. Jednou z variant je velmi využívaný princip dvouhybridového systému, kdy se vytvoří rozdělený transkripční faktor, mající oddělenou DNA vazebnou (BD) a aktivační (AD) doménu. Vlivem světla se tvoří heterodimery, které mohou regulovat transkripci (obr. 2) (Shimizu-Sato a kol. 2002). Variací na toto téma jsou jednokomponentové systémy, které využívají pouze jeden druh proteinu. Je dokonce možné mít transkripční faktor fúzovaný s fotosenzitivní doménou tak, aby světlo přímo ovlivňovalo schopnost vázat se na příslušnou regulační oblast (Motta-Mena a kol. 2014).



Obr. 2: Příklad dvouhybridového systému. Takový systém obsahuje dva proteiny, z nichž jeden obsahuje DNA vazebnou doménu („Binding Domain“, BD), která se váže na operátor promotoru, a druhý trans-aktivační doménu (AD). Oba tyto proteiny obsahují jeden ze dvou proteinů, mezi ně patří fotoreceptor („Photoreceptor“, PR) a jeho vazebný partner („Binding Partner“, BP). Působením světla tyto chimerní proteiny dimerizují a vytváří funkční transkripční faktor. Schéma bylo vytvořeno podle Shimizu-Sato a kol. 2002.

Druhá varianta kombinuje chemickou povahu induktoru a využití světla. Je založena na možnosti měnit schopnost určité molekuly aktivovat transkripci působením světla. Mezi ně patří tzv. „caged molecules“ nebo také „photocaged molecules“ (Mayer a Heckel 2006*), jejichž funkci podle mého názoru nejlépe vystihuje termín „maskované molekuly“. Princip těchto molekul spočívá v „maskování“ induktoru pomocí fotolabilní „chránící“ skupiny tak, aby byla zakryta kritická struktura dané molekuly. Zamezí se tak jejich působení na výkonný aparát buňky. Působením světla se „maska“ odstraní a původní aktivita molekuly induktoru se obnoví (obr. 3) (Young a Deiters 2007b*; Tang a kol. 2013*).



Obr. 3: Princip fungování maskovaných molekul. Maskovaný induktor (vyznačeno červeně) nemůže vykonávat svoji funkci induktoru, dokud je stericky kryt fotolabilní chránicí skupinou (vyznačeno modře). Působením světla chránicí skupina nevratně změní svoji konformaci a oddělí se od induktoru, který se tím stává aktivní a může např. svojí vazbou na určitý transkripční faktor ovlivňovat transkripci. Schéma vytvořeno podle Gautier a kol. 2014, a Binder a kol. 2014.

Třetí způsob zahrnuje světlem regulovatelné proteiny signálních kaskády, které mají vliv na regulaci transkripce v buňce. Můžeme tak narazit na světlem aktivovatelné efekторы signálních drah, jako jsou kinázy, fosfatázy (Möglich, Ayers, a Moffat 2009a), či enzymy vytvářející druhé posly (Folcher a kol. 2014).

Mimo tyto kategorie nacházíme ještě možnost přestavby DNA pomocí světlem regulovatelných Cre rekombináz (Taslimi a kol. 2016), popř. světlem aktivovatelné RNA-polymerázy (Binder a kol. 2014).

3.3 Systémy využívající červené či blízké infračervené světlo

Využití červeného světla pro ovládání optogenetických systémů je výhodné, neboť oproti kratším vlnovým délkám snáze proniká do buněčných struktur a působí na buňky méně toxicky (Robertson, Davis, a Johnson 2013).

Systémy tohoto typu mohou jako efektorové molekuly využívat fytochromy, proteinové senzory původem z rostlin nebo bakterií. Polypeptid fytochromu má na své N-terminální doméně chromofor, který mění působením světla konformaci z cis na trans (M. A. van der Horst a kol. 2005*). Rostlinný fytochrom se může vyskytovat ve dvou strukturálně odlišných stavech, „Pr“ (základní stav) a „Pfr“ (biologicky aktivní stav). Přechod mezi těmito stavy ovlivňuje působení světla, kdy červené světlo (cca 660 nm) vyvolá změnu z „Pr“ (red) základního stavu na „Pfr“ (far-red) aktivní, při blízkém infračerveném světle („Near Infra-Red light“, NIR, tj. cca 740 nm) však dochází k návratu do základního stavu (Smith a Holmes 1977). V průběhu času se molekula fytochromu může do základního stavu vrátit samovolně i ve tmě, avšak působením příslušné vlnové délky se tento proces

urychlí (Taslimi a kol. 2016). Tato reverzibilita umožňuje vytvoření jakéhosi spínače, který nám umožňuje zapínat či vypínat transkripci efektivně oběma směry.

Kromě svého prvního využití u kvasinek, o němž se zmíním později, tento systém našel své uplatnění v savčích buňkách. Byl použit ve formě dvouhybridového systému. Fytochrom PhyB, pocházející z *Arabidopsis thaliana*, byl spojen s aktivační doménou VP16 a jaderným lokalizačním signálem (NLS). Fytochrom se ve své aktivované formě „Pr“ mohl vázat na protein PIF6 (phytochrome-interacting factor 6), ke kterému byla na N-konci ještě připojena doména TetR tetracyklinového represoru, která se vážala na regulační sekvence cílového promotoru. Aby byl systém funkční a mohl být fotoreaktivní, bylo potřeba zajistit dodání chromoforu fytocyanobilinu (PCB), jednoho z degradačních produktů hemu, který živočišné buňky netvoří. Ten byl získán z cyanobakterie *Spirulina* a následně přidán do média (Müller, Engesser, Metzger, a kol. 2013). Jiným způsobem dodání chromoforu PCB bylo vložení genů pro enzymy potřebné pro jeho výrobu do genomu buňky pomocí metod genového inženýrství. Tento způsob umožnil příslušnému organismu, aby si daný chromofor vyráběl sám (Müller, Engesser, Timmer, a kol. 2013).

V případě rostlin sice není nutné uměle dodávat chromofor, který je rostlině vlastní, avšak využití optogenetických systémů v nich má jiné komplikace. Rostliny pro svůj přirozený vývoj potřebují světlo, zejména modré a červené. Mnoho optogenetických systémů ale vyžaduje tmou, aby mohly být regulovány (viz. kapitoly 3.5 a 3.6). Nechceme-li tedy rostlinám upřít bílé světlo, je nasnadě právě využití fytochromů, které mohou být světlem oboustranně regulovány. Můžeme tak potlačit nechtěnou expresi genu působením blízkého infračerveného světla i současného působení bílého světla (Müller a kol. 2014).

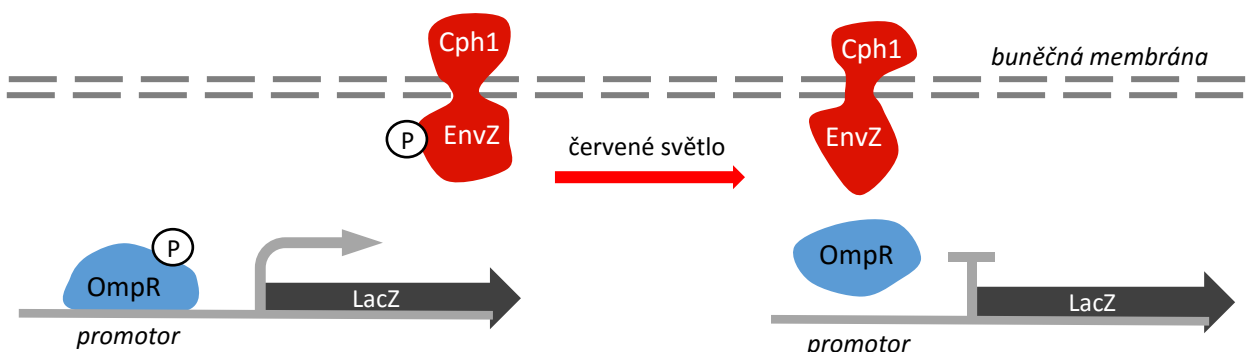
Kromě rostlinných fytochromů se pro optogenetické systémy využívají i bakteriální fytochromy. Jejich aktivační spektrum pro přechod z „Pr“ do „Pfr“ stavu zahrnuje obvykle vyšší vlnové délky (660nm – 700nm), než jak je tomu u fytochromů rostlinných. Výhodou bakteriálních fytochromů je, že mohou jako chromofor využít biliverdin IX α , který umí eukaryotické buňky tvořit samy (Tran a kol. 2014), včetně kvasinek (D. Kim a kol. 2006).

Skutečně nevšední model indukce transkripce vytvořili (Folcher a kol. 2014). Na základě lidské mozkové aktivity, snímané BCI („brain computer interface“) technologií, vytvářeli signál v podobě infračerveného záření (700nm), kterým působili na určitou populaci myších buněk. Tyto buňky kódovaly fytochrom BphG1 z *Rhodobacter sphaeroides*, který plnil roli fotosenzoru. Pokud byl vlivem světla aktivován, začal fungovat jako diguanylát cykláza a fosfodiesteráza, díky čemuž mohl vzniknout druhý posel cyklické diguanosin monofosfát (c-di-GMP). Následná signální kaskáda v těchto buňkách spouštěla transkripci reportérového genu (Folcher a kol. 2014).

Jiný optogenetický systém využil fytochrom BphP1 z *Rhodospseudomonas palustris*. Tento typ fytochromu se řadí mezi tzv. „bathy“ fytochromy, které působením vlnových délek 740 nm – 780 nm

přechází v tomto případě ze základního „Pfr“ (far-red) stavu do aktivního „Pr“ (red) stavu, který dokáže interagovat s proteinem PpsR2. Působení červeného světla (650 nm) naopak tento přechod obrací (Rottwinkel, Oberpichler, a Lamparter 2010). Princip indukce transkripce v této studii opět využívá systému dvou hybridů. Fytochrom BphP1, spojený s DNA vazebnou doménou TetR, vlivem blízkého infračerveného záření (740 nm) interaguje s PspR2, fúzovaným s VP16 aktivační doménou a NLS. Celý komplex se tak může přesunout do jádra, kde spouští transkripci reportérového genu. Působením tmy obě komponenty od sebe disociují a transkripce je potlačena, působením červeného světla (650 nm) se tento proces ještě více urychluje (Kaberniuk, Shemetov, a Verkhusha 2016).

Důkaz, že prostorové rozlišení je velká přednost světlem indukovatelných promotorů, ukazuje práce Levskaya a kol. 2005. Využitím fytochromu Cph1 z cyanobakterie, využívajícího PCB jako chromofor, a bakteriální histidin kinázové domény Env1 byl v bakterii *Escherichia coli* vytvořen chimerní protein, který působením světla pozbyl kinázové aktivity. Důsledkem toho se nemohl fosforylovat odpovídající transkripční faktor OmpR a transkripce příslušného genu nemohla být spuštěna (obr. 4). Reportérový gen v tomto případě kódoval enzym LacZ, který ze substrátu 3,4-cyklohexenoeskuletin β -D-galaktopyranosidu (S-gal) vytvářel černou sraženinu. Působením světla se transkripce tohoto genu zastavila, takže i za přítomnosti S-gal žádná černá sraženina nevznikala a bakteriální kultura v tom místě zůstala světlá. Prakticky pokus dokumentující funkčnost systému vypadal tak, že se na kulturu bakterií nesoucích dvoukomponentový systém posvítilo přes neprůhlednou šablonu, jejíž obraz po určité době na bakteriální kultuře vystoupil jako pozitiv (Levskaya a kol. 2005). Tento systém byl využit nejen pro vizualizaci obsahu šablony, ale i jejích kontur. Bakteriální buňky, které nebyly v kultuře osvětleny, produkovaly signální molekuly, které difundovaly do okolí. Systém byl přitom nastaven tak, že pouze ty buňky, které obdržely signální molekulu a zároveň byly osvětleny, mohly produkovat reportérovou β -galaktosidázu a metabolizovat S-gal. Tuto podmínku splňovaly pouze buňky, které se nacházely na rozhraní mezi tmou a světlem. Výsledkem byla obtažená kontura šablony, ať už měla jakýkoliv tvar (J. J. Tabor a kol. 2009).



Obr. 4: Optogenetický dvoukomponentový systém v *Escherichia coli*. Za tmy je hybridní kináza EnvZ s fotoreceptorovou doménou Cph1 aktivní a fosforyluje transkripční faktor OmpR, který aktivuje transkripci reportérového genu LacZ. Působením červeného světla hybridní kináza přestane být aktivní, transkripční faktor OmpR je nefosforylovaný a nemůže spouštět transkripci reportérového genu LacZ. Schéma bylo vytvořeno podle Levskaya a kol. 2005.

3.4 Zelené systémy

Příbuzné fytochromům jsou kyanobakteriochromy, fotoreceptory kyanobakterií. Jako chromofor rovněž využívají PCB, avšak pro jejich fotokonverzi jsou potřeba jiné, kratší vlnové délky (Hirose a kol. 2008). Podobně jako fytochromy, i bakteriochromy působením určitých vlnových délek přecházejí mezi dvěma konformačními stavy. Z „Pg“ (green) základního stavu se působením zeleného až oranžového světla (cca 530 – 600 nm) dostávají do stavu „Pr“ (red), působením červeného světla (cca 672 nm) se molekula vrací zase do základního stavu (Hirose a kol. 2008; J. J. Tabor, Levskaya, a Voigt 2011).

Pro světlem regulovanou transkripci u bakterie *E. coli* byly využity proteiny CcaS (samotný fotoreceptor) a CcaR (transaktivátor) ze *Synechocystis* sp. PCC 6803, které v tomto organismu zajišťují světlem regulovatelnou transkripci z promotoru P_{cpcG2} (J. J. Tabor, Levskaya, a Voigt 2011; Nakajima a kol. 2016). Působením zeleného světla se CcaS sám fosforyluje a zároveň fosforyluje CcaR, což způsobí, že se CcaR může vázat na regulační sekvence promotoru P_{cpcG2} a tím aktivovat jeho transkripci. Červené světlo tento proces inhibuje, jak uvádí Hirose a kol. 2008. Podobně bylo tohoto systému využito pro transgenní expresi v samotné *Synechocystis* (Miyake a kol. 2014). Jiná studie, která využila stejný modelový organismus, ale nepotvrdila, že by červené světlo transkripci reportérového genu potlačovalo, naopak působení záření obou vlnových délek transkripci ještě více indukovalo (Abe a kol. 2014).

V savčích a rostlinných buňkách byl použit úplně jiný systém pro zelené světlo (Chatelle a kol. 2018). Využil nové třídy fotoreceptorů, které jako chromofor využívají 5' deoxyadenosylkobalamin (AdoB12) (Kutta a kol. 2015). Součástí tohoto systému byla operátorové sekvence CarO a světlem aktivovatelný represor CarH, obojí bakteriálního původu. Chromofor musel být buňkám externě dodáván, savčí buňky tento kofaktor samy syntetizovat neumí (Padmanabhan a kol. 2017*).

3.5 Modré systémy

Systémů, využívajících modré světlo je velké množství, neboť využívají mnoha typů fotoreceptorů, mezi něž patří rhodopsiny, xantopsiny, kryptochromy, fototropiny a proteiny s BLUF doménou (Michael A. van der Horst a Hellingwerf 2004*). Oproti červenému světlu však aplikace modrého světla může být pro organismus škodlivější, například může vyvolat tvorbu peroxidu vodíku, hydroxylových radikálů (Hockberger a kol. 1999) a dalších škodlivých fotoproduktů (Bodvard a kol. 2011).

3.5.1 Fototropinové systémy

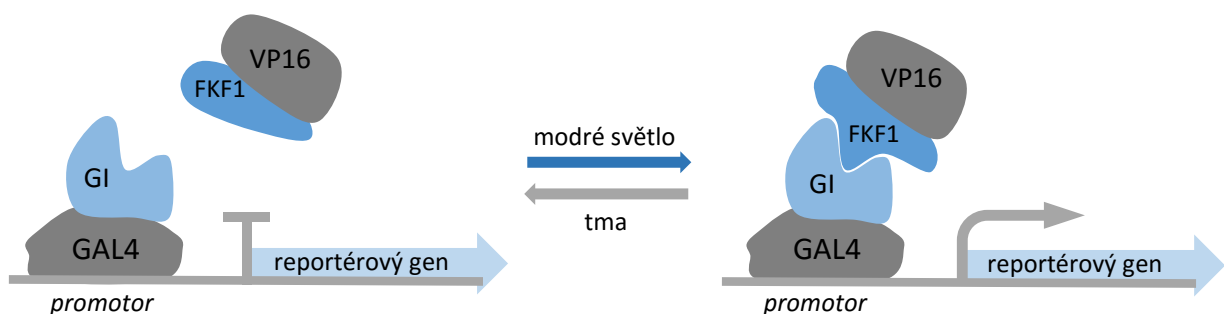
Velký potenciál pro optogenetické využití mají proteiny, zvané fototropiny, podle toho, že ovlivňují růst u rostlin. Domény, které v nich reagují na světlo, se označují jako LOV domény („Light, Oxygene or Voltage“) (Christie a kol. 1999). Tyto domény se řadí mezi tzv. PAS (Per-ARNT-Sim) domény,

kteří se vyskytují často jako senzorové nebo vazebné domény u proteinů signálních drah u různých druhů organismů (Möglich, Ayers, a Moffat 2009b).

Jako chromofor využívají flavinmononukleotid (FMN), popř. flavinadeninindinukleotid (FAD), oba jsou v eukaryotických buňkách přítomné (Müller a kol. 2015), což je výhoda oproti fytochromovým a kyanobakteriochromovým systémům. Působením modrého světla (450 nm) cysteinový zbytek váže LOV doména chromofor kovalentně. Pokud je však tento komplex ponechán ve tmě, postupně se samovolně vrací do základního stavu, kdy je chromofor k LOV doméně vázán pouze nekovalentně. Tato změna se odrazí na struktuře celého LOV proteinu. Na světle dojde k odpoutání jeho centrální části od α -helixu na C-konci, kterému se zpřístupní možnost interagovat s dalšími buněčnými komponentami (Nakasone a kol. 2007).

3.5.1.1 FKF1/GI systém

Jedno z prvních využití LOV domén pro světlem indukovanou genovou expresí bylo demonstrováno na buňkách myší tkáňové kultury pomocí dvouhybridového systému. Byly využity



Obr. 5: Dvouhybridový systém, využívající proteinů FKF1 a GIGANTEA (GI). K FKF1 je připojena transaktivizační doména VP16 a k GI je připojena DNA vazebná doména GAL4. Působením modrého světla FKF1 konformaci díky obsažené LOV doméně, díky čemuž se může vázat na GI. Vniká tak kompletní transkripční faktor, který je schopný indukovat transkripci z daného promotoru. Heterodimer disociuje po určité době ve tmě. Schéma vytvořeno podle Yazawa a kol. 2009.

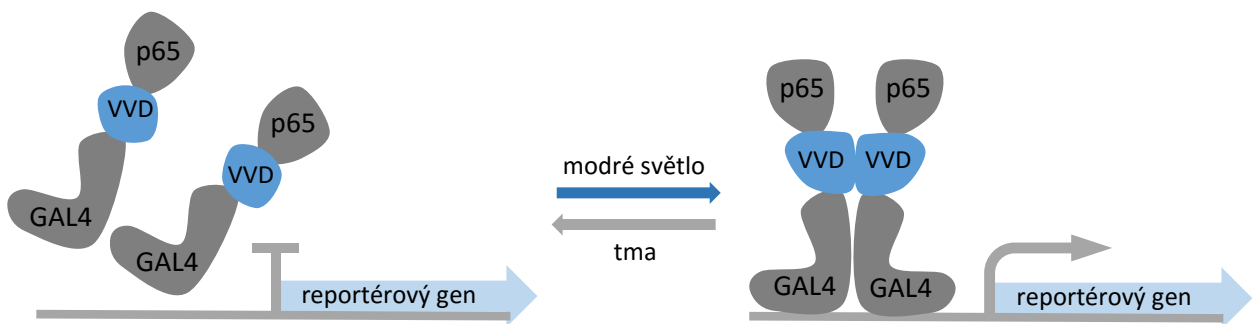
proteiny FKF1 a GIGANTEA (GI), které mezi sebou interagují působením modrého světla, a Gal4/VP16 transkripční systém, kde Gal 4 má DNA vazebnou doménu a VP16 je aktivační doména (viz. 5) (Yazawa a kol. 2009). Další vhodné úpravy systému FKF1/GI přinesly určitá zlepšení co do sníženého pozadí a navýšení transkripční aktivity při světelném působení (Quejada a kol. 2017).

Zcela unikátní možnosti přineslo propojení systému FKF1/GI a „Engineered Zinc finger proteins“ (LITEZ), syntetických DNA vazebných domén typu zinkových prstů. LITEZ byl vytvořen jako první světlem ovládaný transkripční systém, jehož vazebná doména může být navržena specificky pro konkrétní DNA sekvenci dle našich potřeb, například pro různé regulační sekvence některého

promotoru (Polstein a Gersbach 2012). Tato technologie rozšiřuje použití FNF1/GI systému pro širší spektrum různých promotorů (Polstein a Gersbach 2014).

3.5.1.2 „LightOn“ systémy

Jiná studie využila proteinů VVD (VIVID) z *Neurospora crassa*, nejmenších proteinů, které obsahují LOV doménu. VVD vlivem modrého světla tvoří homodimery, a proto byly fúzovány jednak s Gal4 vazebnou doménou a jednak s aktivační doménou proteinu p65, takže vlivem dimerizace se mohl celý komplex vázat na příslušné aktivační sekvence a mohl tak zahájit transkripci (obr. 6). Tento systém se vyskytuje v literatuře též pod názvem „LightOn“ (X. Wang, Chen, a Yang 2012).

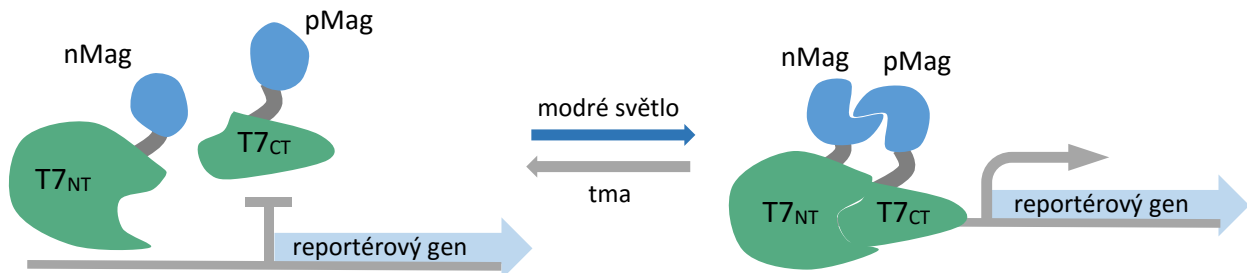


Obr. 6: Jednokomponentový systém „LightOn“, využívající proteinu VIVID (VVD), obsahujícího LOV doménu. K tomuto proteinu je připojena ještě DNA vazebná doména GAL4 a trans-aktivační doména p65. Působením modrého světla se tvoří homodimery, které se mohou vázat na regulační sekvence promotoru a ovlivňovat transkripci. Schéma vytvořeno podle (X. Wang, Chen, a Yang 2012)

Pomocí úprav primární sekvence promotoru (core sekvence promotoru a počet a umístění enhancerů) bylo dále dosaženo minimalizace pozadí na velmi nízkou úroveň (Ma a kol. 2013). „LightOn“ systém se vyznačuje tím, že pouze krátký puls světla je efektivní pro zahájení genové exprese (Chen a kol. 2013). Toho bylo využito pro studium dynamiky přenosu signálu z jedné buňky do druhé, konkrétně signalizace Notch dráhy u savčích buněk (K.-T. Kim a Song 2016; Isomura a Kageyama 2018). Nevýhodou je, že systém do neaktivního stavu přechází poměrně dlouho (2h) a zároveň účinek působení tohoto systému nezávisí přímo úměrně na světelné dávce (Motta-Mena a kol. 2014).

Pokud bychom chtěli využít VVD fotoreceptory pro navození interakce dvou různých proteinů vlivem světla, mimo chtěné heterodimery by se pochopitelně tvořily i přebytečné homodimery. Systém zvaný „Magnets“ (Kawano a kol. 2015) tomuto jevu dokáže předejít. Byly vyvinuty dva rozdílné typy VVD, jejichž interagující oblasti obsahovaly určité nabitě aminokyseliny, jedna varianta VVD obsahovala pozitivně nabitě aminokyseliny (tzv. „positive Magnet“, pMag), druhá varianta VVD obsahovala aminokyseliny nabitě záporně (tzv. „negative Magnet“, nMag). Díky elektrostatickým interakcím tak tvoří dimery pouze dva různě nabitě VVD proteiny. Této možnosti využili (Baumschlager, Aoki, a Khammash 2017) při tvorbě světlem aktivovatelných T7-RNA polymeráz (Opto-T7RNAP). Separátní části této polymerázy obsahují pMag a nMag domény, které umožní polymeráze reasociovat

působením modrého světla a tím ji aktivují (viz. obr. 7) (Baumschlager, Aoki, a Khammash 2017). Původní forma této polymerázy pochází z T7 bakteriofága a své aktivity omezuje pouze pro T7



Obr. 7: Jednokomponentový systém „LightOn“, využívající proteinu VIVID (VVD), obsahujícího LOV doménu. K tomuto proteinu je připojena ještě DNA vazebná doména GAL4 a trans-aktivační doména p65. Působením modrého světla se tvoří homodimery, které se mohou vázat na regulační sekvence promotoru a ovlivňovat transkripci. Schéma vytvořeno podle (X. Wang, Chen, a Yang 2012)

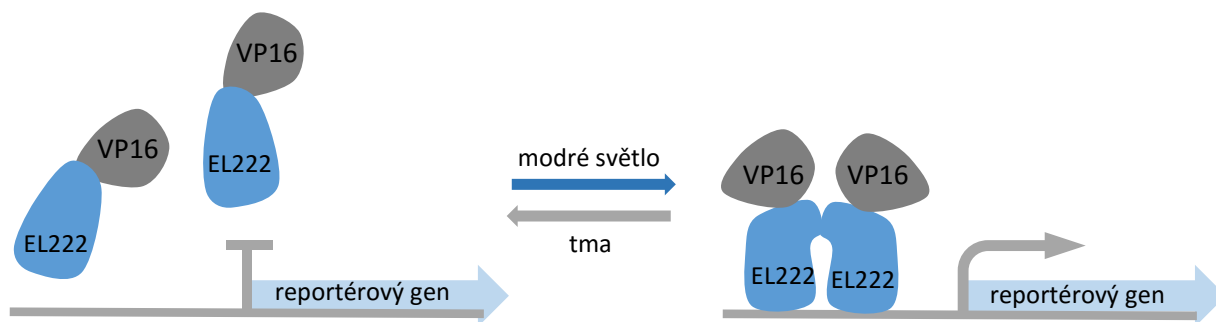
promotor (S. Tabor a Richardson 1985). Důvodem, proč využít právě tuto polymerázu pro transkripci genu našeho zájmu může být fakt, že zde transkripce nebude ovlivněna množstvím přirozené RNA polymerázy v buňce (Baumschlager, Aoki, a Khammash 2017). T7RNAP polymeráza byla již použita i v kvasinkách, kde úspěšně přepisovala oblast za T7 promotorem (Benton a kol. 1990). Pomocí systému „Magnets“ byla mimo jiné vytvořena i světlem aktivovatelná forma Cas9 nukleázy (paCas9), schopná vázat cílovou sekvenci DNA podle specifické „single-guide“ RNA (sgRNA) skoro stejně dobře, jako původní forma Cas9. Tato forma Cas9 ještě dále posouvá možnosti CRISPR/Cas9 technologie, neboť fotoaktivovatelná forma Cas9 nukleázy je kontrolovatelná co do doby působení její aktivity, což může snížit nespecifičnost jejího působení (Nihongaki a kol. 2015).

V případě ostatních, dvouhybridových systémů, zde vystupují jako interagující dvojice jeden fotoreceptor a jeden k němu vazebný protein, který je *de facto* neustále aktivovaný, tj. neustále schopný vazby. V případě LightOn spolu interagují rovnou dva fotosenzory, které musí zároveň být oba naráz aktivované, aby došlo k dimerizaci. Důsledkem této vlastnosti LightOn systémů je dimerizace výhradně vlivem světla, a tedy i nízké pozadí ve srovnání s ostatními systémy (Kawano a kol. 2015).

3.5.1.3 EL222

Další optogenetický systém využívá transkripční faktor EL222 z *Erythrobacter litoralis*, který se působením světla dokáže vázat na DNA (Motta-Mena a kol. 2014). Přirozenou součástí tohoto proteinu je LOV doména a DNA vazebná Helix-Turn-Helix doména (HTH), uměle byla k tomuto proteinu připojena ještě aktivační doména VP16 a NLS. Vlivem modrého světla hybridní transkripční faktor EL222 dimerizuje a váže se na své konkrétní *cis*-regulační sekvence. Ve tmě naopak tyto dvě proteinové komponenty disociují a neaktivní forma LOV domény blokuje jejich schopnost vázat se na

DNA. Výsledkem je tak jednokomponentový transkripční systém (obr. 8), který má dobré kinetické vlastnosti a pro případné úpravy je více předvídatelný, než je tomu v případě dvoukomponentových systémů, nebo dokonce systémů, které využívají signální dráhu (Motta-Mena a kol. 2014).



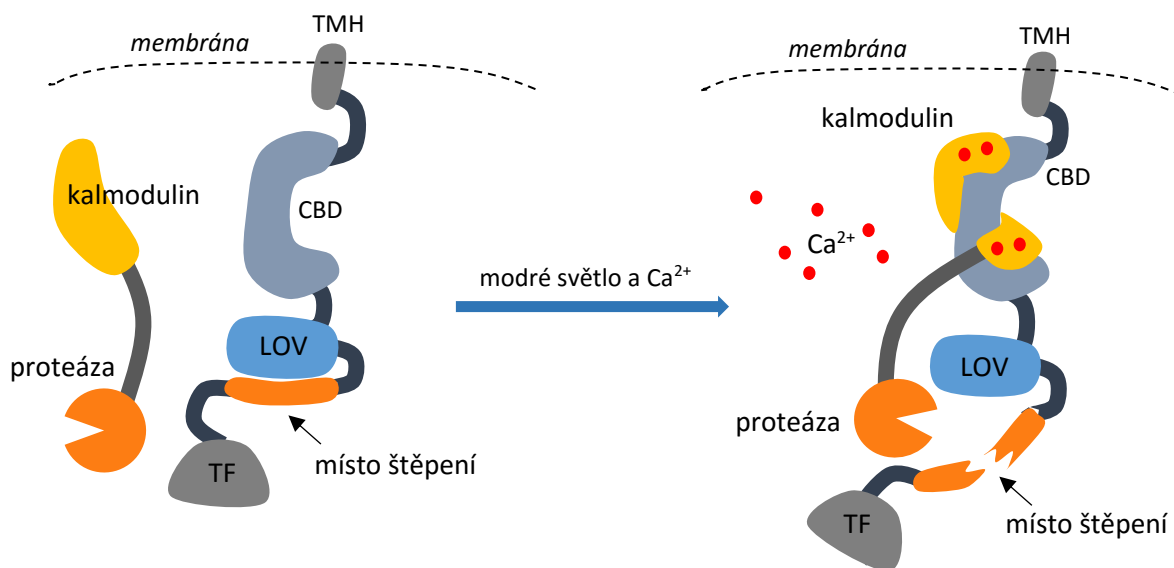
Obr. 8: Jednokomponentový systém, využívající protein EL222, obsahujícího LOV doménu a DNA vazebnou doménu. K tomuto proteinu byla připojena ještě trans-aktivační doména VP16. Působením modrého světla se tvoří homodimery, které se mohou vázat na regulační sekvence promotoru a aktivovat transkripci. Schéma vytvořeno podle (Motta-Mena a kol. 2014).

Systém byl testován v embryích *Danio rerio*, kde byla VP16 aktivační doména nahrazena šetrnější KalTA4 (Reade a kol. 2017). VP16 aktivační doména je transkripčně poměrně silná a může způsobit potlačení transkripce ostatních genů, což může vývoj zárodku *D. rerio* narušit (Triezenberg, Kingsbury, a McKnight 1988; Distel, Wullimann, a Köster 2009). Využití těchto systémů bylo kromě embryí *D. rerio* vyzkoušeno i u lidských tkáňových kultur (Motta-Mena a kol. 2014) a bakterie *E. coli* (Jayaraman a kol. 2016), kde byl transkripční faktor EL222 využit jak pro indukci, tak represi transkripce, díky úpravě vazebných míst pro EL222 před daným promotorem. V jednom případě se totiž EL222 vázal před -10 a -35 regulační oblasti promotoru, což vedlo k indukci exprese, v případě druhém se EL222 vázal mezi tyto oblasti a toto vedlo k umlčení transkripce (Jayaraman a kol. 2016).

3.5.1.4 Systém FLARE, regulace světlem a vápníkem

Mimo samotné odpovědi na světlo se podařilo vytvořit transkripční faktor, který zároveň reguluje hladina vápníku. Systém, který ho využívá, byl nazván FLARE (Fast Light and Activity-Regulated Expression). Své využití si našel zejména v neurovědách pro studium konkrétních neuronových drah v mozku (Lee a kol. 2017). Tento transkripční faktor má v klidovém stavu membránovou lokalizaci. Působením modrého světla se však díky změně konformaci LOV domény odhalí místo pro štěpení. Součástí tohoto membránově lokalizovaného proteinu je i vazební doména pro kalmodulin („Calmodulin Binding Domain“, CBD) (W. Wang a kol. 2017). Kalmodulin je protein, který zajišťuje signální odpověď na přítomnost vápníku, který je schopný vázat (Chin a Means 2000*). Systém FLARE využívá kalmodulin propojený s proteázou, která specificky štěpí sekvenci transkripčního systému FLARE. Při zvýšené hladině vápníku v buňce se tato proteáza pomocí kalmodulinu naváže na FLARE transkripční faktor v membráně, což ji přiblíží ke specifickému místo štěpení. V přítomnosti

o bojího, modrého světla a vápenatých kationtů se transkripční faktor oddělí od membrány a putuje do jádra, kde spouští transkripci příslušných genů (obr. 9) (W. Wang a kol. 2017).



Obr. 9: Systém FLARE, složený z mnoha komponent. Jednu jeho část představuje membránový chimerní protein, obsahující transmembránový helix (TMH), vazebnou doménu pro kalmodulin (CBD), LOV doménu, která stericky brání odhalení štěpícího místa pro specifickou proteázu, a transkripční faktor (TF). Druhý protein se skládá z kalmodulinu a specifické proteázy. Pokud je přítomný vápník, váže se na kalmodulin, který se následně může vázat na CBD. Působením modrého světla se zároveň odhalí místo pro štěpení pro specifickou proteázu. Pokud je tedy přítomen jak vápník, tak modré světlo, transkripční faktor je odštěpen a putuje do jádra, kde spouští transkripci. Schéma bylo vytvořeno podle (W. Wang a kol. 2017).

3.5.1.5 YF1/FixJ kinázový dvoukomponentový systém

Mimo systémy, využívajících transkripční faktory, které dokážou působením světla aktivovat (popř. naopak potlačit) svoji funkci, byla LOV doména využita ke kontrole signální dráhy pomocí světla. Byla vytvořena světlem reprimovatelná kináza YF1 u *E. coli* fúzí LOV domény z bakterie *Bacillus subtilis*, a histidin kinázy z *Bradyrhizobium japonicum* (Möglich, Ayers, a Moffat 2009a). Aktivita této kinázy, ve svém původním organismu regulovaná kyslíkem, ovlivňovala transkripci genů dusíkového metabolismu pomocí transkripčního aktivátoru FixJ. Pokud byl FixJ fosforylovaný, vázal se na regulační sekvence a pozitivně reguloval transkripci pod příslušným promotorem. (Agron a kol. 1994) Uměle vytvořená kináza YF1 měla za tmy kinázovou aktivitu a fosforylovala FixJ, naopak působením světla YF1 působila jako fosfatáza, která defosforylovala FixJ, což ve výsledku potlačilo transkripci cílových genů tohoto systému. (Möglich, Ayers, a Moffat 2009a). Aby zavedení tohoto systému do organismu našeho zájmu bylo snazší, byly vytvořeny dva plazmidy s klonovacími místy pro vložení genu našeho zájmu. Byly vytvořeny tak, aby s jejich využitím bylo možné transkripci regulovat pomocí světla jak negativně, tak i pozitivně (Ohlendorf a kol. 2012). Příkladem použití tohoto systému je světlem indukovaná tvorba biofilmu u bakterie *E. coli* (Jin a Riedel-Kruse 2018).

3.5.1.6 Ostatní principy

Alternativní cestou pro regulaci exprese je využití světlem indukovatelného jaderného lokalizačního systému (LINuS) (Niopek a kol. 2014). Tento systém využívá AsLOV2 doménu z rostliny *Avena sativa*, která stéricky blokuje funkci k ní připojených malých peptidů, jako je např. NLS. Působením světla dojde k jejich odblokování konformační změnou LOV domény (Yumerefendi a kol. 2015). NLS může být připojen na určitý transkripční faktor, který můžeme působením světla přemístit do jádra, kde se pak může podílet na regulaci transkripce příslušných genů. Výhodou tohoto systému je malá velikost této proteinové komponenty. Bylo vyvinuto několik variant LINuS, které vykazují různé hodnoty pozadí nebo schopnost odpovídat na stimul s různou mírou citlivosti a každá jejich varianta se proto hodí pro různé způsoby použití (Niopek a kol. 2014).

3.5.2 CRY domény

Další modré systémy využívají jako fotoreceptor kryptochrom. Jejich název vychází z faktu, že povaha tohoto fotoreceptoru byla dlouho skrytá (M. A. van der Horst a kol. 2005). Dnes víme, že využívají flaviny jako chromofor (Kennedy a kol. 2010), podobně jako u fototropiny s LOV doménami, avšak na rozdíl od nich je nevážou kovalentně (Michael A. van der Horst a Hellingwerf 2004*).

Jako vazebný partner rostlinného kryptochromu CRY2 se využívají proteiny CIB1 či CIBN (cryptochrome-interacting basic-helix-loop-helix), které dimerizují s kryptochromem působením modrého světla (H. Liu a kol. 2008). CRY domény se kromě funkce fotoreceptoru v rostlinách uplatňují při kontrole cirkadiálního rytmu u živočichů (Griffin, Staknis, a Weitz 1999) a patrně mohou fungovat i jako magnetoreceptory (Giachello a kol. 2016).

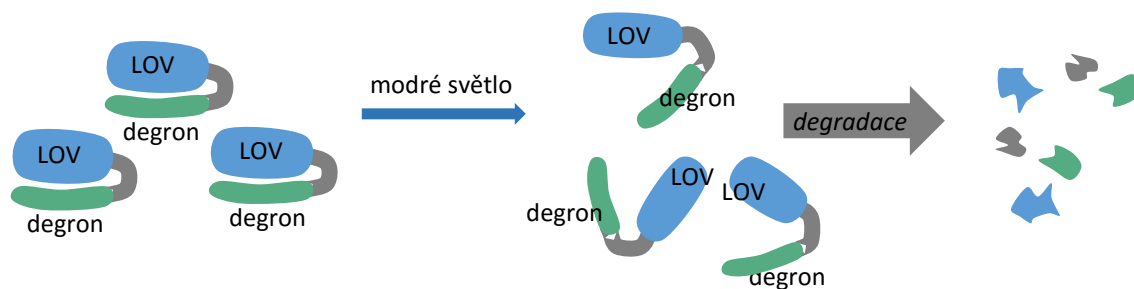
První použití páru CRY2 a CIB1 pro indukci transkripce reportérového genu popisuje (Kennedy a kol. 2010) u kvasinek jako dvouhybridový systém, jeho další použití bylo publikováno u *Drosophila melanogaster* (Chan, Alekseyenko, a Kravitz 2015) a *Chlamydomonas reinhardtii* (Y. Wang a kol. 2017).

Podobně jako výše popsané LITEZ systémy, využívající vazebné domény typu zinkových prstů, využití TALE DNA vazebných domén (Deng a kol. 2014) nebo CRISPR/Cas9 systému (Nihongaki a kol. 2015) umožňuje cílit vazbu optogenetického systému na konkrétní sekvenci v DNA. Kombinace TALE a CRY2/CIB1 domén umožnila vytvoření dvouhybridového systému LITEs („Light Inducible Transcriptional Effectors“) (Konermann a kol. 2013) a podobně i LACE („Light Activated CRISPR/Cas9 Effector“) systému (Polstein a Gersbach 2015). Druhý zmíněný systém byl prezentován jako možný nástroj pro potlačení růstu nádorů s tumor-supresorovými mutacemi (Lin a kol. 2016).

Když se Pathak a kol. 2017 pokoušeli využít CRY2/CIB1 dvouhybridový systém u savčích buněk, narazili na situaci, kdy působením světla hybrid CRY2-BD vykazoval jako transkripční faktor nižší

aktivitu, u některých variant byla transkripce reportéru dokonce vyšší ve tmě. Příčinou byl patrně motiv pro dimerizaci u vazebné domény. Hybrid působením světla dimerizoval, což vedlo pravděpodobně k jeho odstranění, popř. byl v jádře potlačen jiným mechanismem. Odebrání oblasti, která zapříčiňovala dimerizaci u těchto vazebných domén, obnovila schopnost těchto proteinů patřičně na světlo odpovídat.

Využitím systémů, které měly vyšší transkripční aktivitu ve tmě, byl vyvinut CRY2/CIB1 systém, který vlivem světla transkripci naopak zastavoval. Protože i po zastavení transkripce působením světla produkty reportérového genu stále zůstávaly funkční, byl k nim připojen světlem aktivovatelný „degron“, malá peptidová značka, jejíž součástí je i výše zmiňovaná LOV2 doména, která stéricky brání vystavení signálu pro degradaci. Působením světla se tato sekvence odhalí, což ve výsledku vede k degradaci celého proteinu (obr. 10) (Bonger a kol. 2014). Protože LOV2 i CRY2 domény jsou obě aktivovatelné modrým světlem, mohl být pro aktivaci obou částí systémů použit stejný signál (Pathak a kol. 2017).



Obr. 10: Princip fungování světlem ovládaného degradačního signálu, degronu. Ve tmě je tento signál blokován LOV doménou. Působením modrého světla se degron odhalí a celý protein je následně degradován. Schéma bylo vytvořeno podle (Pathak a kol. 2017).

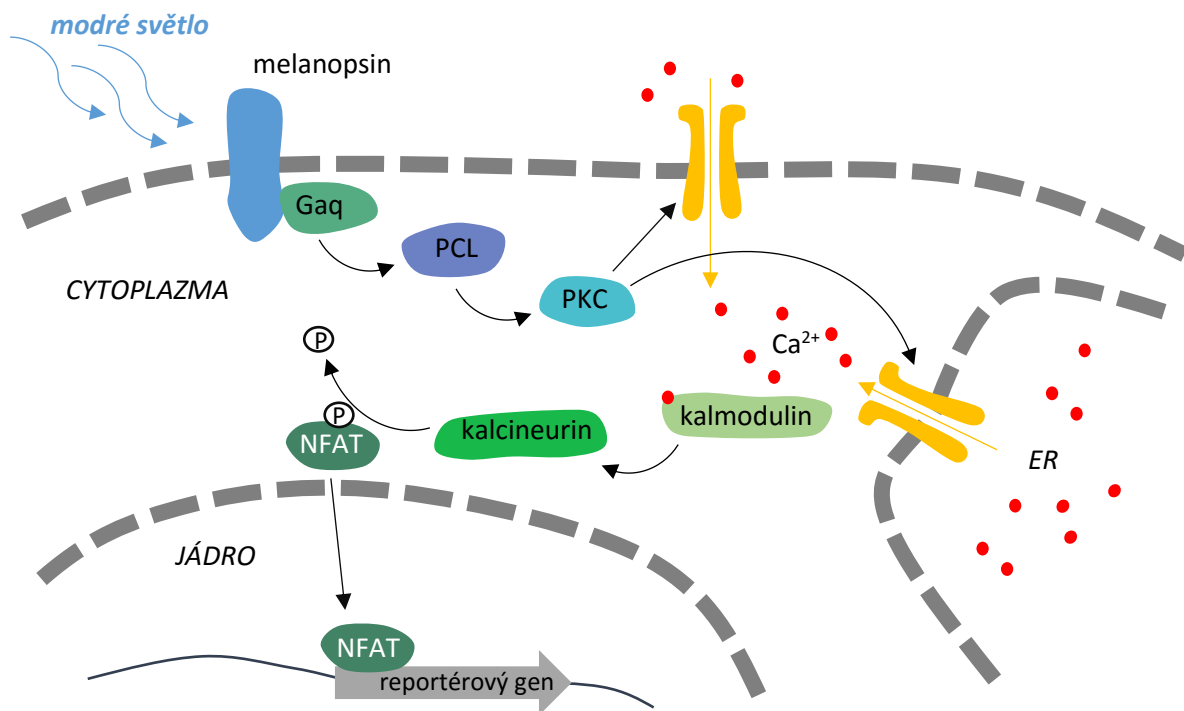
3.5.3 Xantopsinové systémy

Další skupinou fotosenzorů, které byly využity pro kontrolovanou genovou expresi, jsou xantopsiny. Podobně jako LOV domény, jejich funkční struktury jsou podobné PAS doménám. Mezi nimi nacházíme PYP proteiny (Photoactive Yellow Protein), které dostaly svůj název pro absorpční maximum ve žlutém spektru. Jako chromofor využívají kyselinu p-kumarovou (M. A. van der Horst a kol. 2005). Působením modrého světla přechází z „pG“ (ground) stavu do „pB“ (blue-shifted) stavu (Hoff a kol. 1994). Nevýhodou tohoto systému je však nutnost dodávat chromofor externě (Ali a kol. 2015).

Využitím PYP domény byl vyvinut světlem regulovatelný inhibitor transkripčního faktoru CREB (Ali a kol. 2015). CREB je transkripční faktor, účastnící se regulace mnoha genů v savčích buňkách a je aktivován při zvýšené hladině cAMP (Impey a Goodman 2001*). Jeho světlem regulovatelný inhibitor opto-DN-CREB se působením světla vázal na CREB, čímž jej inhiboval (Ali a kol. 2015)

3.5.4 Rhodopsinové systémy

Poměrně odlišnou skupinou fotosenzitivních proteinů, které mohou být využity pro regulaci genové exprese, jsou rhodopsiny. Jako chromofor využívají 11-cis-retinal (Wald 1968). Rhodopsiny jsou součástí fotoreceptorů sítnice oka. Určité druhy rhodopsinů jsou základem pro vidění. Tyto rhodopsiny musí být schopné detekovat lokální kontrasty a změny intenzit ve velmi krátkých časových intervalech (mikrosekundy), aby vidění bylo efektivní a dostatečně ostré (Umino, Solessio, a Barlow 2008). Jiné,



Obr. 11: Signální transdukcce melanopsinového receptoru. Působením modrého světla se receptor melanopsin se aktivuje se přes G protein (Gaq) aktivuje fosfolipázu C (PCL), dále fosfokinázu C (PKC). Ta způsobí otevření vápenatých kanálů (vyznačeny žlutě) na cytoplazmatické membráně a membráně endoplazmatického retikula (ER), takže se hladina vápníku v cytoplasmě náhle zvýší. Vápník se váže na kalmodulin, který následně aktivuje kalcineurin. Kalcineurin defosforyluje transkripční faktor NFAT („Nuclear Factor of Activated T-cells“), který může vstoupit do jádra a aktivovat zde transkripci příslušných genů. Schéma bylo vytvořeno podle (Ye a kol. 2011).

jako je fopigment melanopsin, díky schopnosti detekovat světlo mohou ovlivňovat cirkadiální rytmy živočicha (Provencio a kol. 2000). Melanopsinový receptor je spřažen s G-proteiny, které přes další signální partnery přenáší signál dál. Výsledkem je zvýšená hladina vápenatých kationtů v cytoplasmě a dochází k depolarizaci buněk ipRGC („Intrinsically Photosensitive Retinal Ganglion Cells“) (Qiu a kol. 2005; Sexton, Buhr, a Van Gelder 2012*) V některých buňkách vápenaté kationty fungují jako druhý posel v signálních drah, které nakonec aktivují transkripci určitých genů (Crabtree a Schreiber 2009). Tato dráha by proto mohla být aktivovatelná modrým světlem, pokud bychom regulovali hladinu vápníku v těchto buňkách pomocí melanopsinu. Využitím tohoto principu bylo dosaženo světlem indukované transkripce reportérového genu v různých typech savčích buněk in vitro (podrobnější popis dráhy viz. obr. 11). (Ye a kol. 2011).

3.5.5 BLUF domény

Aby byl výčet využitých fotoreceptorů kompletní, je třeba ještě zmínit proteiny s BLUF doménou („*sensors for Blue-Light Using FAD*“). Podobně jako LOV domény využívají flavinadenindinukleotid jako chromofor, avšak netvoří s ním kovalentní vazbu (M. A. van der Horst a kol. 2005*). BLUF doména byla objevena jako součást světlem aktivovatelné adenylát cyklázy u *Euglena gracilis* (Iseki a kol. 2002), nástroj využívaný v optogenetice (Stewart-Ornstein a kol. 2017).

BLUF doména se též vyskytuje u *Rhodobacter sphaeroides*, kde v rámci dvoukomponentového systému reguluje transkripci určitých genů. Kromě světla tento systém reaguje i na hladinu kyslíku (Han a kol. 2004). BLUF doména však zatím nebyla použita pro vytvoření optogenetického systému pro regulovanou expresi u dalších organismů.

3.6 UV světlo v optogenetice

Přestože UV světlo se může zdát nevýhodné pro optogenetické systémy, pro jeho malou pronikavost a zejména jeho toxicitu (Hollósy 2002), jeho využití nebylo vynecháno. Představuje další alternativu, která se může hodit, pokud bychom například chtěli s využitím různých optogenetických systémů regulovat expresi několika různých genů zároveň nezávisle na sobě (Müller, Engesser, Schulz, a kol. 2013). Jednou z možností je využití UV-B fotoreceptoru z *A. thaliana* UVR8, který působením UV-B světla přestane tvořit homodimery a začne interagovat s vazebným partnerem COP1 (Rizzini a kol. 2011). Tento systém nevyužívá žádnou prostetickou skupinu jako chromofor, pouze aminokyselinu tryptofan, zabudovaný ve struktuře proteinu (Jenkins 2014). Tato světlem indukovaná interakce umožnila vytvoření dvouhybridového systému pro UV-B světlem regulovanou transkripci (Crefcoeur a kol. 2013; Müller, Engesser, Schulz, a kol. 2013).

Jiná studie využila UV-A (320 nm – 400 nm) světlem indukované transkripce pro testování účinnosti opalovacích krémů. Proteinové komponenty zahrnovaly dvojici kryptochrom CRY2 a upravenou variantu jeho vazebného partnera CIB1 (Wieland a kol. 2014), které byly již zmíněny u „modrých“ systémů.

3.7 „Caged molecules“, systémy s maskovanými molekulami

Předchozí způsoby využívají světlo jako přímý induktor, v případě maskovaných molekul světlo samotný induktor pouze odmaskuje. Již poměrně starým příkladem využití tohoto principu je maskovaný estrogen. Byl využit na lidských tkáňových buňkách, u kterých je přirozené, že tento hormon ovlivňuje genovou expresi (Federico G. Cruz, John T. Koh, a Link 2000). Estrogenový receptor se za neaktivovaného stavu váže na protein teplotního šoku (HSP). Po vazbě ligandu-estrogenu se od HSP oddělí a může vázat příslušnou promotorovou oblast (Murdoch a Gorski 1991*). Kromě samotného chráněného estrogenu byly vytvořeny i další chráněné ligandy, jako je hydroxytamoxifen a guanidiotamoxifen, které mohou prostřednictvím vazby na estrogenové

receptory regulovat transkripční odpověď. (Shi a Koh 2004). Podobný ligand, tamoxifen aziridin, využívá systém využívající Cre rekombinázu. Ta je spojená s vazebnou doménou estrogenového receptoru, vázající tamoxifen, proto se rekombináza označuje jako Cre-ER. Vazba světlem „odmaskovaného“ ligandu způsobí odvázáni ER domény od HSP (Link, Shi, a Koh 2005) Všechny tyto případy využily pro svoji funkci chránící skupinu nitroveratryl, který byl z ligandů odstraněn působením UV světla (cca 345 nm). Jeho působení jsou v těchto případech buňky vystaveny několik desítek hodin (Federico G. Cruz, John T. Koh, a Link 2000; Shi a Koh 2004; Link, Shi, a Koh 2005).

Další možností je využití maskovaného isopropyl- β -thio-galaktosidu (IPTG) (Young a Deiters 2007a). Tento induktor se využívá pro indukci promotoru laktóзовého operátoru u bakterií (Donovan, Robinson, a Glick 1996*) a promotorů z něj odvozených (de Boer, Comstock, a Vasser 1983). Jeho přítomnost, spolu s nepřítomností glukózy, indukuje transkripci genů laktóзовého (*lac*) operonu. IPTG se váže na laktóзовý represor (LacI), což způsobí jeho odvázáni od regulační sekvence a umožní transkripci příslušných genů (Kercher, Lu, a Lewis 1997*). (Young a Deiters 2007a) vytvořili fotolabilně maskovaný IPTG, který může obnovit svou funkci induktoru působením UV světla (365 nm).

Další systém využívá „Tet-on“ systém, využívající tetracyklin pro aktivaci transkripce. Tetracyklin se váže na transkripční aktivátor, který následně aktivuje transkripci z *TetO* promotoru (Gossen a kol. 1994). Pro derivát tohoto induktoru, doxycyklin, se podařilo navrhnout vhodnou fotolabilní chránící skupinu, která opět mohla být odstraněna působením UV světla (330 nm – 350 nm) (Cambridge a kol. 2009).

Existuje však i systém, který využívá principu maskování a zároveň je plně optogenetický. Je to systém s maskovanou T7 RNA polymerázou, syntetizovanou *in vivo* v savcích buňkách. Klíčem k vytvoření takové polymerázy je zapojení maskované aminokyseliny, pyrrolysinu, do její aktivní oblasti na místo lysinu (Hemphill a kol. 2013). Pro tuto aminokyselinu však mají tRNA pouze některé bakterie nebo archea (Nozawa a kol. 2009*). Savčí buňky ji nekódují, a tak ji ani neumí zapojit při proteosyntéze. Vložení genů, kódujících pyrrolysin tRNA syntetázu s příslušnou tRNA rozšířilo genetický kód těchto buněk a sekvence TAG, obvykle fungující jako stopkodón, začala kódovat pyrrolysin. Působením UV záření (365 nm) se funkce T7 RNA polymerázy obnovila v důsledku odmaskování lysinu v aktivním centru tohoto enzymu (Hemphill a kol. 2013).

3.8 Světlem indukovatelné promotory u kvasinek

Kvasinkové organismy slouží jako přední modelový eukaryotický organismus v molekulární biologii již mnoho let. Mnoho poznatků o molekulárních mechanismech některých procesů, které zobecňujeme pro eukaryotický svět, bylo získáno právě studiem kvasinek. Ačkoliv je to organismus relativně jednoduchý, sdílí řadu důležitých znaků i s vyššími eukaryoty, včetně člověka. (Botstein a Fink 2011*). Kromě výzkumu jsou kvasinky nepostradatelné v potravinářství, významnou roli hrají při

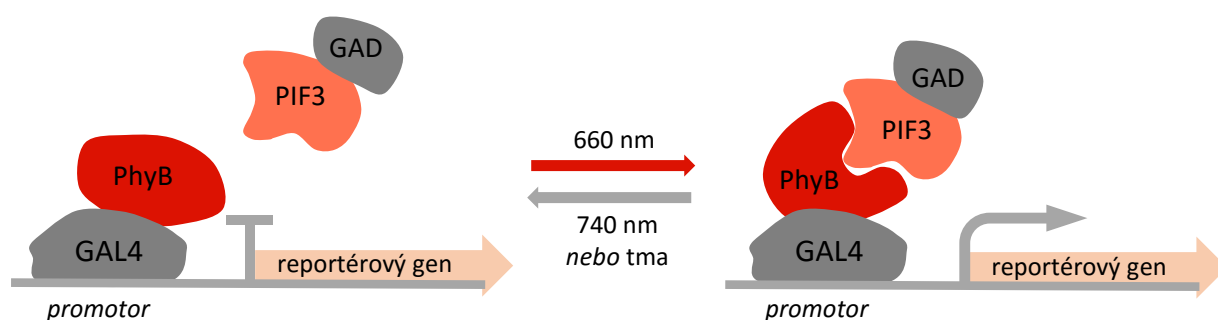
výrobě průmyslově hodnotných látek, jako je ethanol, izobutanol, kys. octová a další (Borodina a Nielsen 2014*), či látek s terapeutickým významem (Paddon a Keasling 2014*).

Jejich nejznámějším zástupcem je běžná pekařská kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*. Již dlouho známe sekvenci celého jejího genomu a mnoho jejích genů bylo charakterizováno co do struktury, tak i jejich funkce. Byla využita jako model pro řadu výzkumných technologií a metod, které ve své době byly teprve v začátku. Využívá se také jako eukaryotický expresní systém (Botstein a Fink 2011*). Podobně důležitá je i *Schizosaccharomyces pombe*, která sdílí podobnost některých molekulárních znaků spíše s vyššími eukaryoty, než kvasinkou *S. cerevisiae* (Russell a Nurse 1986*). *Pichia pastoris* se zase díky svému silnému methanolem indukovanému promotoru využívá pro expresi heterologních proteinů (Ahmad a kol. 2014*).

Světlem indukované promotory mohou napomoci dalšímu studiu a regulaci některých biologických vlastností kvasinek, jako je například buněčný cyklus (Hughes a kol. 2012), nebo naopak mohou pomoci optimalizovat výrobu produktů, které v současné době kvasinky pokrývají (Salinas a kol. 2017*).

3.8.1 Červené systémy u kvasinek

První světlem indukovatelný promotor využívající fytochrom PhyB, byl vytvořen právě u kvasinek, konkrétně *S. cerevisiae* (Shimizu-Sato a kol. 2002). Systém využíval kvasinkový přirozený promotor genu *GAL1* a jeho regulační aparát. DNA vazebná doména Gal4 byla připojena k fytochromu, a k proteinu PIF3 byla připojena aktivační doménou GAD (obr. 12). Jiná práce rozšiřuje tento systém možností synTALE (synthetic transcription activator like effectors) DNA vazebné domény, přístup využitý opět u kvasinek pod názvem PhiReX (Hochrein a kol. 2017), systém podobný savčímu LITEZ zmíněného výše (Polstein a Gersbach 2014).



Obr. 12: Působením červeného světla (660 nm) fotoreceptor PhyB mění konformaci a váže svého vazebného partnera PIF3. Vniká tak kompletní transkripční faktor, který je schopný indukovat transkripci z daného promotoru. Heterodimer disociuje při působení NIR světla, nebo po určité době ve tmě. Schéma bylo vytvořeno podle Shimizu-Sato a kol. 2002.

Mimo fytochromu PhyB a s ním interagujícího partnera PIF3 byly u kvasinek využity i dalších rostlinné fotosystémy, jako jsou PhyA-FHY1 a PhyA-FHL. Systémy rovněž vykazaly určitou hladinu exprese za působení světla příslušné vlnové délky i bez přidání vnějšího chromoforu. Pravděpodobně zde roli chromoforu zastupuje některá jiná látka, která se v buňce vyskytuje (Sorokina a kol. 2009).

Problém s exogenním dodáváním FCB byl i u kvasinek vyřešen přidáním jeho syntetické dráhy u *P. pastoris* (Shin a kol. 2014) a *S. cerevisiae* (Hochrein a kol. 2017).

3.8.2 Modré systémy u kvasinek - fototropiny

U kvasinek se rovněž můžeme setkat s využitím fototropinů a jejich fotocitlivé LOV domény. První dvouhybridový systém s využitím LOV domén byl u kvasinek založen na použití LOV domény z *Avena sativa*, označovanou jako AsLOV2 (Lungu a kol. 2012) U kvasinek byly rovněž testovány světlem indukované jaderné lokalizační signály LINuS, nebyla však u nich s pomocí LINuS vyzkoušena transkripce reportéru (Niopek a kol. 2014). Nedávno byl u kvasinek rovněž použit jednodílný transkripční systém využívající světlem aktivovatelný transkripční faktor EL222 pro optimalizovanou syntézu laktátu, izobutanolu či 2-methyl-1-butanolu (2MBOH) (Zhao a kol. 2018). Další optogenetický dvouhybridový transkripční systém, pojmenovaný jako FUN-LOV (Fungus LOV domains), u kvasinek využil již jmenovaný VVD protein spolu s dalším fotoreceptivním proteinem WC-1 (White Colar 1), který také může s VVD působením modrého světla dimerizovat. Oba proteiny, obsahující LOV doménu, pochází z houby *Neurospora crassa* (Salinas a kol. 2018).

3.8.3 Modré systémy u kvasinek - kryptochromy

První využití systému využívajícího kryptochromy pro spuštění genové exprese bylo prezentováno v práci Kennedy a kol. 2010. Další využití CRY2/CIB1 pro modrým světlem indukovatelný promotor ukázal Hughes a kol. 2012. Mimo klasický dvoukomponentový transkripční systém byla dvojice CRY2 kryptochrom a jeho vazebná doména CIB1 využita na vytvoření světlem aktivovatelné Cre rekombinázy. Byl-li do kvasinkových buněk vložena sekvence reportérového genu *GFP*, jemuž předcházela terminátor, ohraničený rekombinačními *loxP* místy, působením světlem aktivovatelné Cre rekombinázy (PA-Cre) mohla být tato oblast vystřižena a transkripce reportéru obnovena. Později byla vytvořena nová verze PA-Cre, která vykazovala nižší hodnoty pozadí, zvýšení rekombinační aktivity, jakož i delší setrvání v aktivovaném stavu (Taslimi a kol. 2016). Úprava DNA je samozřejmě možná pouze jedním směrem, reportérový gen tím nevratně „zapneme“. Tento systém může být použit například pro navození buněčné diference expresí určitých genů, jako tomu bylo v případě savčích monocytů (Polstein a kol. 2017).

3.8.4 „Caged molecules“ u kvasinek

Další přístup využívá principu odmaskování indukující molekuly vlivem světla. Systémy již využité u kvasinek použily methioninem inhibovaný promotor (Kusen a kol. 2016) či měďnatými kationty

indukovatelný promotor (Kusen a kol. 2017). V případě dříve použitých systémů maskovanými molekulami byla velká nevýhoda nevratnost indukce. V případě systému využívajícího maskovaný methionin, se tato nevýhoda ztrácí, neboť ve chvíli, kdy je zbaven chránící skupiny, je metabolizován. Jeho maskovaná forma proto může být přidána do média v nadbytku a minimálním pulsem UV-A světla se ho uvolní pouze takové množství, které účinně zabrání expresi, avšak nevypotřebuje se veškerá jeho maskovaná forma (Kusen a kol. 2016). V druhém případě použití u kvasinek se jednalo o systém, využívající promotor indukovatelný měďnatými kationty chráněnými fotolabilním chelatačním činidlem DMNT-EDTA při působení UV-A záření. Toto činidlo váže měďnaté kationty s poměrně velkou afinitou oproti jiným kationtům, měďnaté kationty proto disociují z DMNT-EDTA pouze minimálně (Kusen a kol. 2017).

Typ využitého fotoreceptoru	Název systému	Barva světla	V kterých organismech	chromofor	Zdroj - citace
fytochrom	BphG1	NIR	savci	biliverdin IX α	(Folcher a kol. 2014)
fytochrom	BphP1/RpPpsR2	NIR	savci	biliverdin IX α	(Kaberniuk, Shemetov, a Verkhusha 2016)
fytochrom	PhyB/PIF3	červené	kvasinky	PCB	(Shimizu-Sato a kol. 2002), (Sorokina a kol. 2009)
fytochrom	PhyB/PIF6	červené	savci	PCB	(Müller, Engesser, Metzger, a kol. 2013)
fytochrom	PhyB/PIF6	červené	savci a rostliny	PCB	(Müller a kol. 2014).
fytochrom	PhiReX	červené	kvasinky	PCB	(Hochrein a kol. 2017)
fytochrom	EnvZ - OmpR	červené	<i>E. coli</i>	PCB	(Levs kaya a kol. 2005), (Tabor a kol. 2009)
fytochrom	CcaS - CcaR	zelené	<i>E. coli</i>	PCB	(Tabor, Levs kaya, a Voigt 2011), (Miyake a kol. 2014)
fytochrom	CcaS - CcaR	zelené	<i>Synechocystis</i>	PCB	(Abe a kol. 2014)
fytochrom	CcaS - CcaR	zelené	<i>E. coli</i>	PCB	(Nakajima a kol. 2016)
fotoreceptor s AdoB12	CarH - CarO	zelené	savci a rostliny	AdoB12	(Chatelle a kol. 2018)
fototropin	FN1/GI	modré	savci	FMN	(Yazawa a kol. 2009), (Quejada a kol. 2017)
fototropin	LITEZ	modré	savci	<i>nespecifikováno</i>	(Polstein a Gersbach 2012) (Polstein a Gersbach 2014)
fototropin	LightOn (VVD)	modré	savci	FAD	(X. Wang, Chen, a Yang 2012)
fototropin	Magnets	modré	savci	FAD	(Kawano a kol. 2015)
fototropin	Opto-T7RNAP	modré	<i>E. coli</i>	<i>nespecifikováno</i>	(Baumschlager, Aoki, a Khammash 2017)
fototropin	paCas9	modré	savci	<i>nespecifikováno</i>	(Nihongaki a kol. 2015)
fototropin	EL222	modré	savci a <i>Danio rerio</i>	flavin	(Motta-Mena a kol. 2014) (Reade a kol. 2017)

fototropin	EL222	modré	<i>E. coli</i>	<i>nespecifikováno</i>	(Jayaraman a kol. 2016)
fototropin	YF1 - FixJ	modré	<i>E. coli</i>	flavin	(Möglich, Ayers, a Moffat 2009a)
fototropin	pDusk, pDawn	modré	<i>E. coli</i>	FMN	(Ohlendorf a kol. 2012) (Jin a Riedel-Kruse 2018)
fototropin	FLARE	modré	savci	flavin	(W. Wang a kol. 2017)
fototropin	LINuS	modré	savci	FMN	(Niopek a kol. 2014)
fototropin	AsLOV2	modré	kvasinky	FMN	(Lungu a kol. 2012)
fototropin	FUN-LOV	modré	kvasinky	nespecifikováno	(Salinas a kol. 2018)
krytochrom	CRY2/CIB1	modré	kvasinky	flavin	(Kennedy a kol. 2010) (Hughes a kol. 2012)
krytochrom	CRY2/CIB1	modré	<i>Drosophila melanogaster</i>	<i>nespecifikováno</i>	(Chan, Alekseyenko, a Kravitz 2015)
krytochrom	CRY2/CIB1	modré	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	<i>nespecifikováno</i>	(Y. Wang a kol. 2017)
krytochrom	LITE	modré	savci	<i>nespecifikováno</i>	(Konermann a kol. 2013)
krytochrom	LACE	modré	savci	<i>nespecifikováno</i>	(Polstein a Gersbach 2015)
krytochrom	CRY2/CIB1 bidirect	modré	savci	<i>nespecifikováno</i>	(Pathak a kol. 2017)
krytochrom	PA-Cre	modré	kvasinky	FAD	(Taslami a kol. 2016)
rhodopsin	melanopsin	modré	savci	11-cis-retinal	(Ye a kol. 2011)
BLUF-protein	AppA - PpsR	modré	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	FAD	(Han a kol. 2004)
xantopsin	opto-DN-CREB	modré	savci	kyselina p- kumarová	(Ali a kol. 2015)
UV fotoreceptor	UVR8 - COP1	UV-B	savci	žádný	(Crefcoeur a kol. 2013; Müller, Engesser, Schulz, a kol. 2013)
krytochrom	CRY2/CIB1	UV-A	savci	FAD	(Wieland a kol. 2014)

Tab. 1: Přehled optogenetických aparátů použitých pro regulaci transkripce. Tučně jsou vyznačeny systémy použité u kvasinek. Barvou světla je myšlen rozsah vlnových délek 700 nm – 740 nm pro NIR (near infra red) světlo, 660 nm – 670 nm pro červené světlo, 520 nm – 535 nm pro zelené světlo, 447 nm – 474 nm pro modré světlo, 375 nm pro UV-A světlo a 311 nm pro UV-B světlo.

3.9 Omezení systémů, regulujících expresi pomocí světla

3.9.1 Omezení optogenetických systémů

Jako mnoho jiných systémů pro regulovanou transkripci, i systémy regulované světlem mají svá omezení. Abychom maximalizovali výtěžek produkce, budeme zajisté volit co nejsilnější promotor a budeme chtít, aby komponenty optogenetického systému byly v buňce k dispozici v hojném počtu. Ale produkce velkého množství proteinů, které buňka nepotřebuje, může velmi zatížit její metabolismus (Triezenberg, Kingsbury, a McKnight 1988). Proto menší velikost a nižší počet komponent, které systém vyžaduje pro světlem regulovanou expresi našeho genu, jsou výhodné (Motta-Mena a kol. 2014).

Podobně jako jiné indukovatelné promotory, i systémy indukované světlem mají obvykle určitou hladinu pozadí. Podle studie Pathak a kol. 2014, která srovnávala některé optogenetické nástroje pro světlem řízenou heterodimerizaci v kvasinkových buňkách, jako nejspolehlivější z hlediska minimálního pozadí vycházela dvojice fytochrom phyB a jeho vazebný partner PIF6. Hodnoceny byly dále páry phyB a PIF3, kryptochrom CRY2 a jeho vazebný partner CIB a nakonec dimerizační systém TULIPs, využívající LOV domény (Strickland a kol. 2012; Pathak a kol. 2014).

Další parametr, který je třeba zvážit, je, zda daný systém nebude mít účinek na další biologické pochody, kromě indukce transkripce genu našeho zájmu. Nežádoucí pleiotropní efekt mohou mít systémy, které využívají obecných signálních molekul, které v kontextu jiných buněk mohou plnit odlišnou biologickou roli (Ye a kol. 2011). Podobný problém představuje přítomnost regulačních vazebných míst, využívaných pro světlem regulovanou transkripci, i v dalších oblastech genomu využívaného organismu. Například se stává, že TALE nebo podobné vazebné domény, které mohou být vytvořeny specificky pro určitou sekvenci, nejsou vždy plně specifické (Deng a kol. 2014; Nihongaki a kol. 2015).

Pokud si budeme vybírat systém podle vlnové délky světla, jako lepší by se mohly zdát systémy, využívající červené vlnové délky. Takové světlo není tolik absorbováno buněčnými strukturami, tedy proniká hlouběji a zároveň působí i méně toxicky (Robertson, Davis, a Johnson 2013). Na druhé straně však u systémů, přizpůsobených pro kratší vlnové délky (myšleno modré a UV světlo), je možné využít dvoufotonové excitace. V takovém případě stačí použít zdroj světla, jehož fotony mají asi dvojnásobnou vlnovou délku, avšak pro fotoaktivaci molekuly jsou potřeba dva fotony. Oba tyto fotony musí dorazit ke svému cíli ve stejnou chvíli s musí být ve stejné fázi. Dvoufotonová excitace má tedy opět výhodu, že proniká více do hloubky a umožňuje cílit na konkrétní struktury (Denk, Strickler, a Webb 1990). Proto se také pro regulaci optogenetických systémů využívá (Kennedy a kol. 2010; Crefcoeur a kol. 2013; Chan, Alekseyenko, a Kravitz 2015). Výběr vlnové délky také ovlivní volbu případného fluorescenčního reportéru. Pokud je totiž promotor indukován stejnou vlnovou délkou, jaká se využívá k excitaci daného fluoroforu, může docházet ke zkreslení měření (Isomura a Kageyama 2018).

Časové rozlišení systému závisí na tom, jak dlouho po aktivaci fotoreceptor v aktivovaném stavu vydrží, než se postupně dostane zpět do základního stavu. Např. systémy, využívající protein VIVID, mají poločas přechodu z aktivovaného stavu do základního stavu několik hodin. Těmto systémům tak stačí relativně krátký puls a systém může ovlivňovat transkripci i několik hodin (X. Wang, Chen, a Yang 2012). Zkrácený puls světla ušetří organismy zátěže (Robertson, Davis, a Johnson 2013), kterou mohou představovat systémy, vyžadující osvit na několik jednotek až desítek hodin (Chan, Alekseyenko, a Kravitz 2015; Lin a kol. 2016). Na druhou stranu abychom dosáhli časového rozlišení, je lepší, aby byl aktivní stav fotoreaktivní molekuly více labilní (Motta-Mena a kol. 2014). V tomto

ohledu je proto výhodné mít možnost fotoreceptor nejen světlem aktivovat, ale i deaktivovat, jako je tomu u fytochromů (Shimizu-Sato a kol. 2002).

Další omezení představuje typ chromoforu, který systém využívá. Kryptochromy, fototropiny a proteiny s BLUF doménou využívají flaviny, které eukaryotickým buňkám není třeba uměle dodávat (X. Wang, Chen, a Yang 2012). UVR8/COP1 systém indukovatelný UV-B světlem nevyžaduje žádnou specifickou prostetickou skupinu (Müller, Engesser, Schulz, a kol. 2013; Jenkins 2014). U ostatních skupin fotoreceptorů tomu tak není (Provencio a kol. 1998; Shimizu-Sato a kol. 2002; Ali a kol. 2015; Chatelle a kol. 2018). Výjimku mohou představovat bakteriální fytochromy, využívající biliverdin XI α , který je taktéž přítomen v savcích i kvasinkových buňkách (D. Kim a kol. 2006; Tran a kol. 2014).

Nedostupnost chromoforu v buňce se dá řešit buď izolací příslušných chromoforů z jiného zdroje (Shimizu-Sato a kol. 2002), nebo dodáním genů jejich biosyntetických drah do organismu (Shin a kol. 2014; Hochrein a kol. 2017). První varianta se potýká s problémem rovnoměrné distribuce těchto chromoforů mezi buňky, druhá varianta hlouběji zasahuje do vnitřního přirozeného nastavení organismu.

3.9.2 Omezení u „caged molecules“

Využití neoptogenetických systémů, využívajících molekuly, maskované fotolabilní chránicí skupinou, poskytuje oproti optogenetickým systémům jednu výhodu. U kmenů, popř. tkáňových kultur, u kterých již funguje transkripce určitého genu pod určitým konkrétním, chemicky indukovatelným promotorem, stačí využít příslušný maskovaný induktor, pokud jsou již takové k dispozici (Kusen a kol. 2016). Umožní nám to bezprostřední zapojení světla pro regulaci transkripce v takovýchto kmenech i bez předcházejících genetických úprav. Systémy, využívající maskované aminokyseliny, tuto výhodu nesdílí, naopak je třeba organismus patřičně modifikovat, aby mu bylo umožněno danou aminokyselinu kódovat (Hemphill a kol. 2013).

Systémy, založené na maskovaném induktoru sdílí nevýhody s chemicky indukovatelnými promotory (viz. kapitola *Promotory indukovatelné chemicky*), snad až na lepší časové rozlišení maskovaných systémů. Jako chemické induktory také podléhají difuzi, stejně tak je problematická rovnoměrná distribuce těchto látek v biologickém systému (Young a Deiters 2007b). Kromě toho, pokud chránicí skupina nemá dostatečnou afinitu k induktoru, induktor od ní může disociovat i za nepřítomnosti světla, což způsobí vysoké pozadí (Kusen a kol. 2017)

Mimo to, naše pozornost se sice váže k odmaskovanému induktoru, ale otázkou je, co se v buňce děje s odstraněnými chránicími skupinami?

4 Závěr

V současné době existuje mnoho přístupů, které jsou využívány pro regulovanou transkripci u savců, rostlin, bakterií a hub, kvasinek nevyjímaje. Tyto přístupy zahrnují využití jak chemických induktorů, tak působení různých fyzikálních faktorů, neboť v buňkách existují mechanismy, které umí na tyto faktory odpovídat. V poslední době zaznamenaly nárůst transkripční systémy, využívající světlo jako induktor. Oproti využívaným chemickým induktorům se systémy, využívající světlo, vyznačují řadou výhod, jako je vysoké časoprostorové rozlišení působení světla, či možnost opakovaně přepínat mezi aktivací a deaktivací transkripce. Mezi těmito systémy můžeme nalézt dva principiálně odlišné přístupy, optogenetické systémy a systémy využívající maskované molekuly. Optogenetické systémy využívají proteinové fotoreceptory, které působením světla mohou měnit své chemické vlastnosti, zároveň se však po určité době ve tmě (či při světle o určitých vlnových délkách) vrací zpět do základního stavu. U maskovaných molekul induktorů světlo odstraňuje fotolabilní chránící skupinu a tím obnovuje funkci induktoru.

Systémy, využívané v optogenetice pro indukci transkripce světlem, využívají takřka celého viditelného světla spolu s blízkým infra červeným a ultrafialovým zářením typu A a B. Systémy, využívající maskované molekuly, jsou aktivovány zejména působením UV světla. Výjimku tvoří pouze žlutá oblast spektra, která se nevyužívá. Optogenetické transkripční systémy můžeme dále dělit podle využitého typu fotoreceptoru, kterých je podle současných publikací osm. Mechanismy indukce, které systémy využívají, jsou rovněž různorodé. Obvykle je systém koncipován jako dvouhybridový systém s rozděleným transkripčním faktorem, či jako jednokomponentový systém, kde celou regulaci obstarává jediný protein. V jiných případech se využívá signalizační kaskády, fotoaktivovatelných signálních sekvencí, nebo světlem indukovatelné RNA polymerázy či rekombinázy. U maskovaných molekul převládá princip odmaskovaného chemického induktoru, který indukuje jinak chemicky indukovatelné promotory. V případě maskované polymerázy můžeme mluvit o využití jak optogenetiky, principu maskovaných molekul.

U kvasinek byly využity jak optogenetické aparáty, tak maskované molekuly. V některých případech byly použity právě kvasinky jako modelový organismus pro vytvoření nového optogenetického systému. Jiné studie se zaměřily na využití světlem regulované transkripce pro průmyslové účely.

Systémy, využívající světlo pro regulaci transkripce, mají samozřejmě svá omezení a vlastnosti, které je třeba zvážit při výběru. Systémy, které se mohou hodit pro určité účely, mohou být zase nevýhodnou volbou pro účely jiné. V každém případě promotory indukovatelné světlem představují velmi užitečný nástroj jak ve vědě, tak v průmyslu, a vedle tradičních indukovatelných promotorů představují novou perspektivní alternativou.

5 Seznam použité literatury

- Abe, Koichi, Kotone Miyake, Mayumi Nakamura, Katsuhiko Kojima, Stefano Ferri, Kazunori Ikebukuro, a Koji Sode. 2014. „Engineering of a Green-Light Inducible Gene Expression System in *Synechocystis* Sp. PCC6803". *Microbial Biotechnology* 7 (2): 177–83. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12098>.
- Adams, B. G., 1972. „Induction of Galactokinase in *Saccharomyces Cerevisiae*: Kinetics of Induction and Glucose Effects". *Journal of Bacteriology* 111 (2): 308–15.
- Agron, P. G., E. K. Monson, G. S. Ditta, a D. R. Helinski, 1994. „Oxygen regulation of expression of nitrogen fixation genes in *Rhizobium meliloti*". *Research in Microbiology* 145 (5): 454–59. [https://doi.org/10.1016/0923-2508\(94\)90094-9](https://doi.org/10.1016/0923-2508(94)90094-9).
- *Ahmad, Mudassar, Melanie Hirz, Harald Pichler, a Helmut Schwab. 2014. „Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production". *Applied Microbiology and Biotechnology* 98 (12): 5301–17. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5732-5>.
- *Alberts B, Johnson A, Lewis J, Lewis M, K Raff, P. Walter, 2015. „Molecular biology of the cell, 6th edition“. *Garland Science*, New York and Abingdon, UK. 2014. ISBN: 9780815344643
- Ali, Ahmed M., Jakeb M. Reis, Yan Xia, Asim J. Rashid, Valentina Mercaldo, Brandon J. Walters, Katherine E. Brechun, a kol. 2015. „Optogenetic Inhibitor of the Transcription Factor CREB". *Chemistry & Biology* 22 (11): 1531–39. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2015.09.018>.
- Baumschlager, Armin, Stephanie K. Aoki, a Mustafa Khammash. 2017. „Dynamic Blue Light-Inducible T7 RNA Polymerases (Opto-T7RNAPs) for Precise Spatiotemporal Gene Expression Control". *ACS Synthetic Biology* 6 (11): 2157–67. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.7b00169>.
- Benton, B M, W K Eng, J J Dunn, F W Studier, R Sternglanz, a P A Fisher. 1990. „Signal-mediated import of bacteriophage T7 RNA polymerase into the *Saccharomyces cerevisiae* nucleus and specific transcription of target genes." *Molecular and Cellular Biology* 10 (1): 353–60.
- *Binder, Dennis, Claus Bier, Alexander Grünberger, Dagmar Drobietz, Jennifer Hage-Hülsmann, Georg Wandrey, Jochen Büchs, a kol. 2016. „Photocaged Arabinose: A Novel Optogenetic Switch for Rapid and Gradual Control of Microbial Gene Expression". *ChemBioChem* 17 (4): 296–99. <https://doi.org/10.1002/cbic.201500609>.
- Binder, Dennis, Alexander Grünberger, Anita Loeschke, Christopher Probst, Claus Bier, Jörg Pietruszka, Wolfgang Wiechert, Dietrich Kohlheyer, Karl-Erich Jaeger, a Thomas Drepper. 2014. „Light-Responsive Control of Bacterial Gene Expression: Precise Triggering of the Lac Promoter Activity Using Photocaged IPTG". *Integrative Biology: Quantitative Biosciences from Nano to Macro* 6 (8): 755–65. <https://doi.org/10.1039/c4ib00027g>.
- *Blazek, John, a Hal S. Alper. 2013. „Promoter Engineering: Recent Advances in Controlling Transcription at the Most Fundamental Level". *Biotechnology Journal* 8 (1): 46–58. <https://doi.org/10.1002/biot.201200120>.
- Bliss, Alfred Frederick. 1946. „THE CHEMISTRY OF DAYLIGHT VISION". *The Journal of General Physiology* 29 (5): 277–97.
- Bodvard, Kristofer, David Wrangborg, Sofia Tapani, Katarina Logg, Piotr Sliwa, Anders Blomberg, Mats Kvarnström, a Mikael Käll. 2011. „Continuous Light Exposure Causes Cumulative Stress That Affects the Localization Oscillation Dynamics of the Transcription Factor Msn2p". *Biochimica Et Biophysica Acta* 1813 (2): 358–66. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.12.004>.
- Boer, H A de, L J Comstock, a M Vasser. 1983. „The tac promoter: a functional hybrid derived from the trp and lac promoters." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80 (1): 21–25.
- Bonger, Kimberly M., Rishi Rakhit, Alexander Y. Payumo, James K. Chen, a Thomas J. Wandless. 2014. „A General Method for Regulating Protein Stability with Light". *ACS chemical biology* 9 (1): 111–15. <https://doi.org/10.1021/cb400755b>.
- *Borodina, Irina, a Jens Nielsen. 2014. „Advances in Metabolic Engineering of Yeast *Saccharomyces Cerevisiae* for Production of Chemicals". *Biotechnology Journal* 9 (5): 609–20. <https://doi.org/10.1002/biot.201300445>.

- Borthwick, H. A., a H. M. Cathey. 1962. „Significance of Dark Reversion of Phytochrome in Flowering of Short-Day Plants". *Science (New York, N.Y.)* 136 (3513): 324. <https://doi.org/10.1126/science.136.3513.324-b>.
- *Botstein, David, a Gerald R. Fink. 2011. „Yeast: An Experimental Organism for 21st Century Biology". *Genetics* 189 (3): 695–704. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.130765>.
- Brent, R., a M. Ptashne. 1985. „A Eukaryotic Transcriptional Activator Bearing the DNA Specificity of a Prokaryotic Repressor". *Cell* 43 (3 Pt 2): 729–36.
- Cambridge, Sidney B., Daniel Geissler, Federico Calegari, Konstantinos Anastassiadis, Mazahir T. Hasan, A. Francis Stewart, Wieland B. Huttner, Volker Hagen, a Tobias Bonhoeffer. 2009. „Doxycycline-Dependent Photoactivated Gene Expression in Eukaryotic Systems". *Nature Methods* 6 (7): 527–31. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1340>.
- Crabtree, Gerald R., a Stuart L. Schreiber. 2009. „SnapShot: Ca²⁺-Calcineurin-NFAT Signaling". *Cell* 138 (1): 210-210.e1. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.06.026>.
- Crefcoeur, Remco P., Ruohe Yin, Roman Ulm, a Thanos D. Halazonetis. 2013. „Ultraviolet-B-Mediated Induction of Protein-Protein Interactions in Mammalian Cells". *Nature Communications* 4: 1779. <https://doi.org/10.1038/ncomms2800>.
- Cregg, J. M., K. J. Barringer, A. Y. Hessler, a K. R. Madden. 1985. „Pichia Pastoris as a Host System for Transformations". *Molecular and Cellular Biology* 5 (12): 3376–85.
- *Da Silva, Nancy A., a Sneha Srikrishnan. 2012. „Introduction and Expression of Genes for Metabolic Engineering Applications in *Saccharomyces Cerevisiae*". *FEMS Yeast Research* 12 (2): 197–214. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2011.00769.x>.
- Dehoux, P., V. Ribes, E. Sobczak, a R. E. Streeck. 1986. „Expression of the Hepatitis B Virus Large Envelope Protein in *Saccharomyces Cerevisiae*". *Gene* 48 (1): 155–63.
- Deng, Dong, Chuangye Yan, Jianping Wu, Xiaojing Pan, a Nieng Yan. 2014. „Revisiting the TALE repeat". *Protein & Cell* 5 (4): 297–306. <https://doi.org/10.1007/s13238-014-0035-2>.
- Denk, W., J. H. Strickler, a W. W. Webb. 1990. „Two-Photon Laser Scanning Fluorescence Microscopy". *Science (New York, N.Y.)* 248 (4951): 73–76.
- Distel, Martin, Mario F. Wullimann, a Reinhard W. Köster. 2009. „Optimized Gal4 genetics for permanent gene expression mapping in zebrafish". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (32): 13365–70. <https://doi.org/10.1073/pnas.0903060106>.
- *Donovan, R. S., C. W. Robinson, a B. R. Glick. 1996. „Review: Optimizing Inducer and Culture Conditions for Expression of Foreign Proteins under the Control of the Lac Promoter". *Journal of Industrial Microbiology* 16 (3): 145–54.
- Douglas, H. C., a D. C. Hawthorne. 1964. „Enzymatic Expression and Genetic Linkage of Genes Controlling Galactose Utilization in *Saccharomyces*". *Genetics* 49 (5): 837–44.
- *Etcheverry, T. 1990. „Induced Expression Using Yeast Copper Metallothionein Promoter". *Methods in Enzymology* 185: 319–29.
- Federico G. Cruz, * and John T. Koh, a Kristian H. Link. 2000. „Light-Activated Gene Expression". Rapid-communication. 23. srpen 2000. <https://doi.org/10.1021/ja001804h>.
- Folcher, Marc, Sabine Oesterle, Katharina Zwicky, Thushara Thekkottil, Julie Heymoz, Muriel Hohmann, Matthias Christen, Marie Daoud El-Baba, Peter Buchmann, a Martin Fussenegger. 2014. „Mind-Controlled Transgene Expression by a Wireless-Powered Optogenetic Designer Cell Implant". *Nature Communications* 5 (listopad): 5392. <https://doi.org/10.1038/ncomms6392>.
- Freddolino, Peter L., Kevin H. Gardner, a Klaus Schulten. 2013. „Signaling Mechanisms of LOV Domains: New Insights from Molecular Dynamics Studies". *Photochemical & Photobiological Sciences: Official Journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* 12 (7): 1158–70. <https://doi.org/10.1039/c3pp25400c>.
- Froehlich, Allan C., Yi Liu, Jennifer J. Loros, a Jay C. Dunlap. 2002. „White Collar-1, a Circadian Blue Light Photoreceptor, Binding to the Frequency Promoter". *Science (New York, N.Y.)* 297 (5582): 815–19. <https://doi.org/10.1126/science.1073681>.
- Fujita, Yasuko, Hideki Tohda, Yuko Giga-Hama, a Kaoru Takegawa. 2006. „Heat Shock-Inducible Expression Vectors for Use in *Schizosaccharomyces Pombe*". *FEMS Yeast Research* 6 (6): 883–87. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2006.00093.x>.

- *Gautier, Arnaud, Carole Gauron, Michel Volovitch, David Bensimon, Ludovic Jullien, a Sophie Vríz. 2014. „How to Control Proteins with Light in Living Systems". *Nature Chemical Biology* 10 (7): 533–41. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1534>.
- Giachello, Carlo N. G., Nigel S. Scrutton, Alex R. Jones, a Richard A. Baines. 2016. „Magnetic Fields Modulate Blue-Light-Dependent Regulation of Neuronal Firing by Cryptochrome". *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 36 (42): 10742–49. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2140-16.2016>.
- Gossen, Manfred, Angelika L Bonin, Sabine Freundlieb, a Hermann Bujard. 1994. „Inducible gene expression systems for higher eukaryotic cells". *Current Opinion in Biotechnology* 5 (5): 516–20. [https://doi.org/10.1016/0958-1669\(94\)90067-1](https://doi.org/10.1016/0958-1669(94)90067-1).
- Griffin, E. A., D. Staknis, a C. J. Weitz. 1999. „Light-Independent Role of CRY1 and CRY2 in the Mammalian Circadian Clock". *Science (New York, N.Y.)* 286 (5440): 768–71.
- Han, Yuchen, Stephan Braatsch, Lisa Osterloh, a Gabriele Klug. 2004. „A Eukaryotic BLUF Domain Mediates Light-Dependent Gene Expression in the Purple Bacterium *Rhodospira rubra*". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101 (33): 12306–11. <https://doi.org/10.1073/pnas.0403547101>.
- Hemphill, James, Chungjung Chou, Jason W. Chin, a Alexander Deiters. 2013. „Genetically Encoded Light-Activated Transcription for Spatio-Temporal Control of Gene Expression and Gene Silencing in Mammalian Cells". *Journal of the American Chemical Society* 135 (36): 13433–39. <https://doi.org/10.1021/ja4051026>.
- Hirose, Yuu, Takashi Shimada, Rei Narikawa, Mitsunori Katayama, a Masahiko Ikeuchi. 2008. „Cyanobacteriochrome CcaS is the green light receptor that induces the expression of phycobilisome linker protein". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (28): 9528–33. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801826105>.
- Hockberger, P. E., T. A. Skimina, V. E. Centonze, C. Lavin, S. Chu, S. Dadrás, J. K. Reddy, a J. G. White. 1999. „Activation of Flavin-Containing Oxidases Underlies Light-Induced Production of H₂O₂ in Mammalian Cells". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (11): 6255–60.
- Hoff, W D, I H van Stokkum, H J van Ramesdonk, M E van Brederode, A M Brouwer, J C Fitch, T E Meyer, R van Grondelle, a K J Hellingwerf. 1994. „Measurement and global analysis of the absorbance changes in the photocycle of the photoactive yellow protein from *Ectothiorhodospira halophila*". *Biophysical Journal* 67 (4): 1691–1705.
- Hochrein, Lena, Fabian Machens, Katrin Messerschmidt, a Bernd Mueller-Roeber. 2017. „PhiReX: A Programmable and Red Light-Regulated Protein Expression Switch for Yeast". *Nucleic Acids Research* 45 (15): 9193–9205. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx610>.
- Hollósy, F. 2002. „Effects of Ultraviolet Radiation on Plant Cells". *Micron (Oxford, England: 1993)* 33 (2): 179–97.
- *Horst, M. A. van der, W. Laan, S. Yeremenko, A. Wende, P. Palm, D. Oesterhelt, a K. J. Hellingwerf. 2005. „From Primary Photochemistry to Biological Function in the Blue-Light Photoreceptors PYP and AppA". *Photochemical & Photobiological Sciences: Official Journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* 4 (9): 688–93. <https://doi.org/10.1039/b418442b>.
- *Horst, Michael A. van der, a Klaas J. Hellingwerf. 2004. „Photoreceptor Proteins, ‚Star Actors of Modern Times‘: A Review of the Functional Dynamics in the Structure of Representative Members of Six Different Photoreceptor Families". *Accounts of Chemical Research* 37 (1): 13–20. <https://doi.org/10.1021/ar020219d>.
- Huang, Qian, Jim K. Hu, Frank Lohr, Li Zhang, Rod Braun, Jennifer Lanzen, John B. Little, Mark W. Dewhirst, a Chuan-Yuan Li. 2000. „Heat-Induced Gene Expression as a Novel Targeted Cancer Gene Therapy Strategy". *Cancer Research* 60 (13): 3435–39.
- Huber, P. E., M. J. Mann, L. G. Melo, A. Ehsan, D. Kong, L. Zhang, M. Rezvani, a kol. 2003. „Focused Ultrasound (HIFU) Induces Localized Enhancement of Reporter Gene Expression in Rabbit Carotid Artery". *Gene Therapy* 10 (18): 1600–1607. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302045>.

- Hughes, Robert M., Steven Bolger, Hersh Tapadia, a Chandra L. Tucker. 2012. „Light-Mediated Control of DNA Transcription in Yeast". *Methods (San Diego, Calif.)* 58 (4): 385–91. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2012.08.004>.
- Chan, Yick-Bun, Olga V. Alekseyenko, a Edward A. Kravitz. 2015. „Optogenetic Control of Gene Expression in *Drosophila*". *PloS One* 10 (9): e0138181. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138181>.
- Chatelle, Claire, Rocio Ochoa Fernandez, Raphael Engesser, Nils Schneider, Hannes Beyer, Alex Jones, Jens Timmer, Matias D. Zurbriggen, a Wilfried Weber. 2018. „A Green Light-Responsive System for the Control of Transgene Expression in Mammalian and Plant Cells". *ACS Synthetic Biology*, duben. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.7b00450>.
- Chau, Rosanna Man Wah, Devaki Bhaya, a Kerwyn Casey Huang. 2017. „Emergent Phototactic Responses of Cyanobacteria under Complex Light Regimes". *mBio* 8 (2). <https://doi.org/10.1128/mBio.02330-16>.
- Chen, Xianjun, Xue Wang, Zengmin Du, Zhengcai Ma, a Yi Yang. 2013. „Spatiotemporal Control of Gene Expression in Mammalian Cells and in Mice Using the LightOn System". *Current Protocols in Chemical Biology* 5 (2): 111–29. <https://doi.org/10.1002/9780470559277.ch120267>.
- *Chin, D., a A. R. Means. 2000. „Calmodulin: A Prototypical Calcium Sensor". *Trends in Cell Biology* 10 (8): 322–28.
- Chowdhury, S., K. W. Smith, a M. C. Gustin. 1992. „Osmotic Stress and the Yeast Cytoskeleton: Phenotype-Specific Suppression of an Actin Mutation". *The Journal of Cell Biology* 118 (3): 561–71.
- Christie, John M., Michael Salomon, Kazunari Nozue, Masamitsu Wada, a Winslow R. Briggs. 1999. „LOV (light, oxygen, or voltage) domains of the blue-light photoreceptor phototropin (nph1): Binding sites for the chromophore flavin mononucleotide". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (15): 8779–83.
- *Impey, S., a R. H. Goodman. 2001. „CREB Signaling--Timing Is Everything". *Science's STKE: Signal Transduction Knowledge Environment* 2001 (82): pe1. <https://doi.org/10.1126/stke.2001.82.pe1>.
- Iseki, Mineo, Shigeru Matsunaga, Akio Murakami, Kaoru Ohno, Kiyoshi Shiga, Kazuichi Yoshida, Michizo Sugai, Tetsuo Takahashi, Terumitsu Hori, a Masakatsu Watanabe. 2002. „A Blue-Light-Activated Adenylyl Cyclase Mediates Photoavoidance in *Euglena Gracilis*". *Nature* 415 (6875): 1047–51. <https://doi.org/10.1038/4151047a>.
- Isomura, Akihiro, a Ryoichiro Kageyama. 2018. „An Optogenetic Method to Control and Analyze Gene Expression Patterns in Cell-to-Cell Interactions". *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, č. 133 (březen). <https://doi.org/10.3791/57149>.
- Jayaraman, Premkumar, Kavya Devarajan, Tze Kwang Chua, Hanzhong Zhang, Erry Gunawan, a Chueh Loo Poh. 2016. „Blue Light-Mediated Transcriptional Activation and Repression of Gene Expression in Bacteria". *Nucleic Acids Research* 44 (14): 6994–7005. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw548>.
- Jenkins, Gareth I. 2014. „The UV-B Photoreceptor UVR8: From Structure to Physiology". *The Plant Cell* 26 (1): 21–37. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.119446>.
- Jin, Xiaofan, a Ingmar H. Riedel-Kruse. 2018. „Biofilm Lithography Enables High-Resolution Cell Patterning via Optogenetic Adhesin Expression". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115 (14): 3698–3703. <https://doi.org/10.1073/pnas.1720676115>.
- *Johnston, M. 1987. „A Model Fungal Gene Regulatory Mechanism: The GAL Genes of *Saccharomyces Cerevisiae*". *Microbiological Reviews* 51 (4): 458–76.
- Kaberniuk, Andrii A., Anton A. Shemetov, a Vladislav V. Verkhusha. 2016. „A Bacterial Phytochrome-Based Optogenetic System Controllable with near-Infrared Light". *Nature Methods* 13 (7): 591–97. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3864>.
- Kawano, Fuun, Hideyuki Suzuki, Akihiro Furuya, a Moritoshi Sato. 2015. „Engineered Pairs of Distinct Photoswitches for Optogenetic Control of Cellular Proteins". *Nature Communications* 6 (únor): 6256. <https://doi.org/10.1038/ncomms7256>.

- Kennedy, Matthew J., Robert M. Hughes, Leslie A. Peteya, Joel W. Schwartz, Michael D. Ehlers, a Chandra L. Tucker. 2010. „Rapid Blue-Light-Mediated Induction of Protein Interactions in Living Cells". *Nature Methods* 7 (12): 973–75. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1524>.
- *Kercher, Michele A, Ponzy Lu, a Mitchell Lewis. 1997. „Lac repressor—operator complex". *Current Opinion in Structural Biology* 7 (1): 76–85. [https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(97\)80010-3](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(97)80010-3).
- Kim, Donghak, Erik T. Yukl, Pierre Moëgne-Loccoz, a Paul R. Ortiz de Montellano. 2006. „Fungal Heme Oxygenases: Functional Expression and Characterization of Hmx1 from *Saccharomyces Cerevisiae* and CaHmx1 from *Candida Albicans*". *Biochemistry* 45 (49): 14772–80. <https://doi.org/10.1021/bi061429r>.
- Kim, Kyung-Tai, a Mi-Ryoung Song. 2016. „Light-Induced Notch Activity Controls Neurogenic and Gliogenic Potential of Neural Progenitors". *Biochemical and Biophysical Research Communications* 479 (4): 820–26. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.09.124>.
- Kjaerulff, Søren, a Olaf Nielsen. 2015. „An IPTG-Inducible Derivative of the Fission Yeast Nmt Promoter". *Yeast (Chichester, England)* 32 (6): 469–78. <https://doi.org/10.1002/yea.3073>.
- Kochhar, V. K., S. Kochhar, a H. Mohr. 1981. „An Analysis of the Action of Light on Betalain Synthesis in the Seedling of *Amaranthus Caudatus*, Var. *Viridis*". *Planta* 151 (1): 81–87. <https://doi.org/10.1007/BF00384241>.
- Komada, Sayaka, Yuichi Kamae, Mitsumasa Koyanagi, Kousuke Tatewaki, Ehab Hassaneen, ASM Saifullah, Taishi Yoshii, Akihisa Terakita, a Kenji Tomioka. 2015. „Green-sensitive opsin is the photoreceptor for photic entrainment of an insect circadian clock". *Zoological letters* 1 (únor). <https://doi.org/10.1186/s40851-015-0011-6>.
- Konermann, Silvana, Mark D. Brigham, Alexandro Trevino, Patrick D. Hsu, Matthias Heidenreich, Le Cong, Randall J. Platt, David A. Scott, George M. Church, a Feng Zhang. 2013. „Optical Control of Mammalian Endogenous Transcription and Epigenetic States". *Nature* 500 (7463): 472–76. <https://doi.org/10.1038/nature12466>.
- Kort, R, W D Hoff, M Van West, A R Kroon, S M Hoffer, K H Vlieg, W Crieaand, J J Van Beumen, a K J Hellingwerf. 1996. „The xanthopsins: a new family of eubacterial blue-light photoreceptors." *The EMBO Journal* 15 (13): 3209–18.
- Kusen, Peter M., Georg Wandrey, Vera Krewald, Martina Holz, Sonja Meyer Zu Berstenhorst, Jochen Büchs, a Jörg Pietruszka. 2017. „Light-Controlled Gene Expression in Yeast Using Photocaged Cu²⁺". *Journal of Biotechnology* 258 (září): 117–25. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.04.032>.
- Kusen, Peter M., Georg Wandrey, Christopher Probst, Alexander Grünberger, Martina Holz, Sonja Meyer Zu Berstenhorst, Dietrich Kohlheyer, Jochen Büchs, a Jörg Pietruszka. 2016. „Optogenetic Regulation of Tunable Gene Expression in Yeast Using Photo-Labile Caged Methionine". *ACS Chemical Biology* 11 (10): 2915–22. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.6b00462>.
- Kutta, Roger J., Samantha J. O. Hardman, Linus O. Johannissen, Bruno Bellina, Hanan L. Messiha, Juan Manuel Ortiz-Guerrero, Montserrat Elías-Arnanz, a kol. 2015. „The photochemical mechanism of a B12-dependent photoreceptor protein". *Nature Communications* 6 (srpen). <https://doi.org/10.1038/ncomms8907>.
- *Labbé, S., a D. J. Thiele. 1999. „Copper Ion Inducible and Repressible Promoter Systems in Yeast". *Methods in Enzymology* 306: 145–53.
- Lee, Dongmin, Jung Ho Hyun, Kanghoon Jung, Patrick Hannan, a Hyung-Bae Kwon. 2017. „A Calcium- and Light-Gated Switch to Induce Gene Expression in Activated Neurons". *Nature Biotechnology* 35 (9): 858–63. <https://doi.org/10.1038/nbt.3902>.
- Levskaya, Anselm, Aaron A. Chevalier, Jeffrey J. Tabor, Zachary Booth Simpson, Laura A. Lavery, Matthew Levy, Eric A. Davidson, a kol. 2005. „Synthetic Biology: Engineering *Escherichia Coli* to See Light". *Nature* 438 (7067): 441–42. <https://doi.org/10.1038/nature04405>.
- Lin, Fan, Liang Dong, Weiming Wang, Yuchen Liu, Weiren Huang, a Zhiming Cai. 2016. „An Efficient Light-Inducible P53 Expression System for Inhibiting Proliferation of Bladder Cancer Cell". *International Journal of Biological Sciences* 12 (10): 1273–78. <https://doi.org/10.7150/ijbs.16162>.
- Link, Kristian H., Youheng Shi, a John T. Koh. 2005. „Light Activated Recombination". *Journal of the American Chemical Society* 127 (38): 13088–89. <https://doi.org/10.1021/ja0531226>.

- Liu, Hongtao, Xuhong Yu, Kunwu Li, John Klejnot, Hongyun Yang, Dominique Lisiero, a Chentao Lin. 2008. „Photoexcited CRY2 Interacts with CIB1 to Regulate Transcription and Floral Initiation in Arabidopsis". *Science (New York, N.Y.)* 322 (5907): 1535–39. <https://doi.org/10.1126/science.1163927>.
- Liu, Tao, Jing-Yu Chen, Zhong Zheng, Tian-Hong Wang, a Guo-Qiang Chen. 2005. „Construction of Highly Efficient E. Coli Expression Systems Containing Low Oxygen Induced Promoter and Partition Region". *Applied Microbiology and Biotechnology* 68 (3): 346–54. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-1913-6>.
- Losi, Aba, Eugenia Polverini, Benjamin Quest, a Wolfgang Gärtner. 2002. „First evidence for phototropin-related blue-light receptors in prokaryotes." *Biophysical Journal* 82 (5): 2627–34.
- Louvion, J. F., B. Havaux-Copf, a D. Picard. 1993. „Fusion of GAL4-VP16 to a Steroid-Binding Domain Provides a Tool for Gratuitous Induction of Galactose-Responsive Genes in Yeast". *Gene* 131 (1): 129–34.
- Lungu, Oana I., Ryan A. Hallett, Eun Jung Choi, Mary J. Aiken, Klaus M. Hahn, a Brian Kuhlman. 2012. „Designing photoswitchable peptides using the AsLOV2 domain". *Chemistry & biology* 19 (4): 507–17. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2012.02.006>.
- Ma, Zhengcai, Zengmin Du, Xianjun Chen, Xue Wang, a Yi Yang. 2013. „Fine Tuning the LightOn Light-Switchable Transgene Expression System". *Biochemical and Biophysical Research Communications* 440 (3): 419–23. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.09.092>.
- Martínez-Montañés, Fernando, Alessandro Rienzo, Daniel Poveda-Huertes, Amparo Pascual-Ahuir, a Markus Proft. 2013. „Activator and Repressor Functions of the Mot3 Transcription Factor in the Osmostress Response of *Saccharomyces Cerevisiae*". *Eukaryotic Cell* 12 (5): 636–47. <https://doi.org/10.1128/EC.00037-13>.
- *Mayer, Günter, a Alexander Heckel. 2006. „Biologically Active Molecules with a ‚Light Switch‘". *Angewandte Chemie (International Ed. in English)* 45 (30): 4900–4921. <https://doi.org/10.1002/anie.200600387>.
- *Miesenböck, Gero. 2009. „The Optogenetic Catechism". *Science (New York, N.Y.)* 326 (5951): 395–99. <https://doi.org/10.1126/science.1174520>.
- Miyake, Kotone, Koichi Abe, Stefano Ferri, Mitsuharu Nakajima, Mayumi Nakamura, Wataru Yoshida, Katsuhiko Kojima, Kazunori Ikebukuro, a Koji Sode. 2014. „A green-light inducible lytic system for cyanobacterial cells". *Biotechnology for Biofuels* 7 (duben): 56. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-7-56>.
- Möglich, Andreas, Rebecca A. Ayers, a Keith Moffat. 2009a. „Design and Signaling Mechanism of Light-Regulated Histidine Kinases". *Journal of Molecular Biology* 385 (5): 1433–44. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.12.017>.
- Möglich A, Ayers RA, Moffat K, 2009b. „Structure and Signaling Mechanism of Per-ARNT-Sim Domains". *Structure (London, England: 1993)* 17 (10): 1282–94. <https://doi.org/10.1016/j.str.2009.08.011>.
- *Morano, Kevin A., Chris M. Grant, a W. Scott Moye-Rowley. 2012. „The Response to Heat Shock and Oxidative Stress in *Saccharomyces cerevisiae*". *Genetics* 190 (4): 1157–95. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.128033>.
- Motta-Mena, Laura B., Anna Reade, Michael J. Mallory, Spencer Glantz, Orion D. Weiner, Kristen W. Lynch, a Kevin H. Gardner. 2014. „An Optogenetic Gene Expression System with Rapid Activation and Deactivation Kinetics". *Nature Chemical Biology* 10 (3): 196–202. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1430>.
- Müller, Konrad, Raphael Engesser, Stéphanie Metzger, Simon Schulz, Michael M. Kämpf, Moritz Busacker, Thorsten Steinberg, a kol. 2013. „A Red/Far-Red Light-Responsive Bi-Stable Toggle Switch to Control Gene Expression in Mammalian Cells". *Nucleic Acids Research* 41 (7): e77. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt002>.
- Müller, Konrad, Raphael Engesser, Simon Schulz, Thorsten Steinberg, Pascal Tomakidi, Cornelia C. Weber, Roman Ulm, Jens Timmer, Matias D. Zurbriggen, a Wilfried Weber. 2013. „Multi-chromatic control of mammalian gene expression and signaling". *Nucleic Acids Research* 41 (12): e124. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt340>.
- Müller, Konrad, Raphael Engesser, Jens Timmer, Ferenc Nagy, Matias D. Zurbriggen, a Wilfried Weber. 2013. „Synthesis of Phycocyanobilin in Mammalian Cells". *Chemical*

- Communications (Cambridge, England)* 49 (79): 8970–72.
<https://doi.org/10.1039/c3cc45065a>.
- *Müller, Konrad, Sebastian Naumann, Wilfried Weber, a Matias D. Zurbriggen. 2015. „Optogenetics for Gene Expression in Mammalian Cells". *Biological Chemistry* 396 (2): 145–52.
<https://doi.org/10.1515/hsz-2014-0199>.
- Müller, Konrad, David Siegel, Fernando Rodriguez Jahnke, Katrin Gerrer, Sabrina Wend, Eva L. Decker, Ralf Reski, Wilfried Weber, a Matias D. Zurbriggen. 2014. „A Red Light-Controlled Synthetic Gene Expression Switch for Plant Systems". *Molecular BioSystems* 10 (7): 1679–88.
<https://doi.org/10.1039/c3mb70579j>.
- *Murdoch, Fern E, a Jack Gorski. 1991. „The role of ligand in estrogen receptor regulation of gene expression". *Molecular and Cellular Endocrinology* 78 (3): C103–8.
[https://doi.org/10.1016/0303-7207\(91\)90114-8](https://doi.org/10.1016/0303-7207(91)90114-8).
- Nakajima, Mitsuharu, Koichi Abe, Stefano Ferri, a Koji Sode. 2016. „Development of a Light-Regulated Cell-Recovery System for Non-Photosynthetic Bacteria". *Microbial Cell Factories* 15 (únor): 31.
<https://doi.org/10.1186/s12934-016-0426-6>.
- Nakasone, Yusuke, Takeshi Eitoku, Daisuke Matsuoka, Satoru Tokutomi, a Masahide Terazima. 2007. „Dynamics of Conformational Changes of Arabidopsis Phototropin 1 LOV2 with the Linker Domain". *Journal of Molecular Biology* 367 (2): 432–42.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.12.074>.
- Nihongaki, Yuta, Fuun Kawano, Takahiro Nakajima, a Moritoshi Sato. 2015. „Photoactivatable CRISPR-Cas9 for Optogenetic Genome Editing". *Nature Biotechnology* 33 (7): 755–60.
<https://doi.org/10.1038/nbt.3245>.
- Niopek, Dominik, Dirk Benzinger, Julia Roensch, Thomas Draebing, Pierre Wehler, Roland Eils, a Barbara Di Ventura. 2014. „Engineering Light-Inducible Nuclear Localization Signals for Precise Spatiotemporal Control of Protein Dynamics in Living Cells". *Nature Communications* 5 (červenec): 4404.
<https://doi.org/10.1038/ncomms5404>.
- *Nozawa, Kayo, Patrick O'Donoghue, Sarath Gundllapali, Yuhei Arais, Ryuichiro Ishitani, Takuya Umehara, Dieter Soll, a Osamu Nureki. 2009. „Pyrrolysyl-tRNA synthetase:tRNAPyl structure reveals the molecular basis of orthogonality". *Nature* 457 (7233): 1163–67.
<https://doi.org/10.1038/nature07611>.
- Ohlendorf, Robert, Roe R. Vidavski, Avigdor Eldar, Keith Moffat, a Andreas Möglich. 2012. „From Dusk till Dawn: One-Plasmid Systems for Light-Regulated Gene Expression". *Journal of Molecular Biology* 416 (4): 534–42.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.01.001>.
- Ortner, Viktoria, Cornelius Kaspar, Christian Halter, Lars Töllner, Olga Mykhaylyk, Johann Walzer, Walter H. Günzburg, John A. Dangerfield, Christine Hohenadl, a Thomas Czerny. 2012. „Magnetic Field-Controlled Gene Expression in Encapsulated Cells". *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society* 158 (3): 424–32.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2011.12.006>.
- Ottoz, Diana S. M., Fabian Rudolf, a Joerg Stelling. 2014. „Inducible, Tightly Regulated and Growth Condition-Independent Transcription Factor in *Saccharomyces Cerevisiae*". *Nucleic Acids Research* 42 (17): e130.
<https://doi.org/10.1093/nar/gku616>.
- *Paddon, Chris J., a Jay D. Keasling. 2014. „Semi-Synthetic Artemisinin: A Model for the Use of Synthetic Biology in Pharmaceutical Development". *Nature Reviews. Microbiology* 12 (5): 355–67.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro3240>.
- *Padmanabhan, S., Marco Jost, Catherine L. Drennan, a Montserrat Elías-Arnanz. 2017. „A New Facet of Vitamin B12: Gene Regulation by Cobalamin-Based Photoreceptors". *Annual Review of Biochemistry* 86 (červen): 485–514.
<https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-044500>.
- Pathak, Gopal P., Jessica I. Spiltoir, Camilla Höglund, Lauren R. Polstein, Sari Heine-Koskinen, Charles A. Gersbach, Jari Rossi, a Chandra L. Tucker. 2017. „Bidirectional Approaches for Optogenetic Regulation of Gene Expression in Mammalian Cells Using Arabidopsis Cryptochrome 2". *Nucleic Acids Research* 45 (20): e167.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkx260>.
- Pathak, Gopal P., Devin Strickland, Justin D. Vrana, a Chandra L. Tucker. 2014. „Benchmarking of Optical Dimerizer Systems". *ACS Synthetic Biology* 3 (11): 832–38.
<https://doi.org/10.1021/sb500291r>.

- Plathow, Christian, Frank Lohr, Gabriela Divkovic, Guido Rademaker, Nabeel Farhan, Peter Peschke, Ivan Zuna, a kol. 2005. „Focal Gene Induction in the Liver of Rats by a Heat-Inducible Promoter Using Focused Ultrasound Hyperthermia: Preliminary Results". *Investigative Radiology* 40 (11): 729–35.
- Polstein, Lauren R., a Charles A. Gersbach. 2012. „Light-Inducible Spatiotemporal Control of Gene Activation by Customizable Zinc Finger Transcription Factors". *Journal of the American Chemical Society* 134 (40): 16480–83. <https://doi.org/10.1021/ja3065667>.
- Polstein LR, Gersbach CA, 2014. „Light-Inducible Gene Regulation with Engineered Zinc Finger Proteins". *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 1148: 89–107. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0470-9_7.
- Polstein LR, Gersbach CA, 2015. „A light-inducible CRISPR/Cas9 system for control of endogenous gene activation". *Nature chemical biology* 11 (3): 198–200. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1753>.
- Polstein, Lauren R., Mark Juhas, Gabi Hanna, Nenad Bursac, a Charles A. Gersbach. 2017. „An Engineered Optogenetic Switch for Spatiotemporal Control of Gene Expression, Cell Differentiation, and Tissue Morphogenesis". *ACS Synthetic Biology* 6 (11): 2003–13. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.7b00147>.
- Price, V. L. 1997. „Inducible Expression Cassettes in Yeast: ADH2". *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 62: 149–57. <https://doi.org/10.1385/0-89603-480-1:149>.
- Provencio, Ignacio, Guisen Jiang, Willem J. De Grip, William Pär Hayes, a Mark D. Rollag. 1998. „Melanopsin: An opsin in melanophores, brain, and eye". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (1): 340–45.
- Provencio, Ignacio, Ignacio Rodriguez, Guisen Jiang, William Pär Hayes, Edson Moreira, a Mark Rollag. 2000. „A Novel Human Opsin in the Inner Retina". *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 20 (únor): 600–605. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-02-00600.2000>.
- Qiu, Xudong, Tida Kumbalasing, Stephanie M. Carlson, Kwoon Y. Wong, Vanitha Krishna, Ignacio Provencio, a David M. Berson. 2005. „Induction of Photosensitivity by Heterologous Expression of Melanopsin". *Nature* 433 (7027): 745–49. <https://doi.org/10.1038/nature03345>.
- Quejada, Jose R., Seon-Hye E. Park, Daniel W. Awari, Fan Shi, Hannah E. Yamamoto, Fuun Kawano, Juergen C. Jung, a Masayuki Yazawa. 2017. „Optimized light-inducible transcription in mammalian cells using Flavin Kelch-repeat F-box1/GIGANTEA and CRY2/CIB1". *Nucleic Acids Research* 45 (20): e172. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx804>.
- Rajkumar, Arun S., Guodong Liu, David Bergenholm, Dushica Arsovska, Mette Kristensen, Jens Nielsen, Michael K. Jensen, a Jay D. Keasling. 2016. „Engineering of Synthetic, Stress-Responsive Yeast Promoters". *Nucleic Acids Research* 44 (17): e136. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw553>.
- Reade, Anna, Laura B. Motta-Mena, Kevin H. Gardner, Didier Y. Stainier, Orion D. Weiner, a Stephanie Woo. 2017. „TAEL: a zebrafish-optimized optogenetic gene expression system with fine spatial and temporal control". *Development (Cambridge, England)* 144 (2): 345–55. <https://doi.org/10.1242/dev.139238>.
- Rizzini, Luca, Jean-Jacques Favory, Catherine Cloix, Davide Faggionato, Andrew O'Hara, Eirini Kaiserli, Ralf Baumeister, a kol. 2011. „Perception of UV-B by the Arabidopsis UVR8 Protein". *Science (New York, N.Y.)* 332 (6025): 103–6. <https://doi.org/10.1126/science.1200660>.
- Robertson, James Brian, Chris R. Davis, a Carl Hirschie Johnson. 2013. „Visible light alters yeast metabolic rhythms by inhibiting respiration". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (52): 21130–35. <https://doi.org/10.1073/pnas.1313369110>.
- Rottwinkel, Gregor, Inga Oberpichler, a Tilman Lamparter. 2010. „Bathy Phytochromes in Rhizobial Soil Bacteria". *Journal of Bacteriology* 192 (19): 5124–33. <https://doi.org/10.1128/JB.00672-10>.
- Rubenstrunk, Anne, Capucine Trollet, Cécile Orsini, a Daniel Scherman. 2005. „Positive in Vivo Heterologous Gene Regulation by Electric Pulses Delivery with Metallothionein I Gene Promoter". *The Journal of Gene Medicine* 7 (12): 1565–72. <https://doi.org/10.1002/jgm.811>.

- *Russell, P., a P. Nurse. 1986. „Schizosaccharomyces Pombe and Saccharomyces Cerevisiae: A Look at Yeasts Divided". *Cell* 45 (6): 781–82.
- Sadowski, I., J. Ma, S. Triezenberg, a M. Ptashne. 1988. „GAL4-VP16 Is an Unusually Potent Transcriptional Activator". *Nature* 335 (6190): 563–64. <https://doi.org/10.1038/335563a0>.
- *Salinas, Francisco, Vicente Rojas, Verónica Delgado, Eduardo Agosin, a Luis F. Larrondo. 2017. „Optogenetic Switches for Light-Controlled Gene Expression in Yeast". *Applied Microbiology and Biotechnology* 101 (7): 2629–40. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8178-8>.
- Salinas, Francisco, Vicente Rojas, Veronica Delgado, Javiera Lopez, Eduardo Agosin, a Luis F. Larrondo. 2018. „FUN-LOV: Fungal LOV Domains for Optogenetic Control of Gene Expression and Flocculation in Yeast". *BioRxiv*, březem, 285296. <https://doi.org/10.1101/285296>.
- *Sexton, Timothy, Ethan Buhr, a Russell N. Van Gelder. 2012. „Melanopsin and Mechanisms of Non-visual Ocular Photoreception". *The Journal of Biological Chemistry* 287 (3): 1649–56. <https://doi.org/10.1074/jbc.R111.301226>.
- Sharrock, R. A., a P. H. Quail. 1989. „Novel Phytochrome Sequences in Arabidopsis Thaliana: Structure, Evolution, and Differential Expression of a Plant Regulatory Photoreceptor Family". *Genes & Development* 3 (11): 1745–57.
- Shenton, Daniel, a Chris M Grant. 2003. „Protein S-thiolation targets glycolysis and protein synthesis in response to oxidative stress in the yeast Saccharomyces cerevisiae." *Biochemical Journal* 374 (Pt 2): 513–19. <https://doi.org/10.1042/BJ20030414>.
- Shenton, Daniel, Julia B. Smirnova, Julian N. Selley, Kathleen Carroll, Simon J. Hubbard, Graham D. Pavitt, Mark P. Ashe, a Chris M. Grant. 2006. „Global Translational Responses to Oxidative Stress Impact upon Multiple Levels of Protein Synthesis". *The Journal of Biological Chemistry* 281 (39): 29011–21. <https://doi.org/10.1074/jbc.M601545200>.
- Shi, Youheng, a John T. Koh. 2004. „Light-Activated Transcription and Repression by Using Photocaged SERMs". *Chembiochem: A European Journal of Chemical Biology* 5 (6): 788–96. <https://doi.org/10.1002/cbic.200300823>.
- Shimizu-Sato, Sae, Enamul Huq, James M. Tepperman, a Peter H. Quail. 2002. „A Light-Switchable Gene Promoter System". *Nature Biotechnology* 20 (10): 1041–44. <https://doi.org/10.1038/nbt734>.
- Shin, Ah-Young, Yun-Jeong Han, Pill-Soon Song, a Jeong-Il Kim. 2014. „Expression of Recombinant Full-Length Plant Phytochromes Assembled with Phytochromobilin in Pichia Pastoris". *FEBS Letters* 588 (17): 2964–70. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.05.050>.
- Smith, Harry, a M. G. Holmes. 1977. „The Function of Phytochrome in the Natural Environment—Iii. Measurement and Calculation of Phytochrome Photoequilibria". *Photochemistry and Photobiology* 25 (6): 547–50. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1977.tb09126.x>.
- Solow, Steven P., Jennifer Sengbusch, a Michael W. Laird. 2005. „Heterologous Protein Production from the Inducible MET25 Promoter in Saccharomyces Cerevisiae". *Biotechnology Progress* 21 (2): 617–20. <https://doi.org/10.1021/bp049916q>.
- Sorokina, Oxana, Anita Kapus, Kata Terecskei, Laura E. Dixon, Laszlo Kozma-Bognar, Ferenc Nagy, a Andrew J. Millar. 2009. „A Switchable Light-Input, Light-Output System Modelled and Constructed in Yeast". *Journal of Biological Engineering* 3 (září): 15. <https://doi.org/10.1186/1754-1611-3-15>.
- St John, T. P., a R. W. Davis. 1981. „The Organization and Transcription of the Galactose Gene Cluster of Saccharomyces". *Journal of Molecular Biology* 152 (2): 285–315.
- Stewart-Ornstein, Jacob, Susan Chen, Rajat Bhatnagar, Jonathan S. Weissman, a Hana El-Samad. 2017. „Model-Guided Optogenetic Study of PKA Signaling in Budding Yeast". *Molecular Biology of the Cell* 28 (1): 221–27. <https://doi.org/10.1091/mbc.E16-06-0354>.
- Strickland, Devin, Yuan Lin, Elizabeth Wagner, C. Matthew Hope, Josiah Zayner, Chloe Antoniou, Tobin R. Sosnick, Eric L. Weiss, a Michael Glotzer. 2012. „TULIPs: Tunable, light-controlled interacting protein tags for cell biology". *Nature methods* 9 (4): 379–84. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1904>.
- Suzuki, M., Y. Kamei, S. Yuba, a S. Takagi. 2006. „A technique enabling the controlled gene expression in targeted single cells of C. elegans". In *2006 IEEE International Symposium on MicroNanoMechanical and Human Science*, 1–5. <https://doi.org/10.1109/MHS.2006.320244>.

- Tabor, Jeffrey J., Anselm Levskaya, a Christopher A. Voigt. 2011. „Multichromatic Control of Gene Expression in Escherichia Coli". *Journal of Molecular Biology* 405 (2): 315–24. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.10.038>.
- Tabor, Jeffrey J., Howard M. Salis, Zachary Booth Simpson, Aaron A. Chevalier, Anselm Levskaya, Edward M. Marcotte, Christopher A. Voigt, a Andrew D. Ellington. 2009. „A Synthetic Genetic Edge Detection Program". *Cell* 137 (7): 1272–81. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.04.048>.
- Tabor, S, a C C Richardson. 1985. „A bacteriophage T7 RNA polymerase/promoter system for controlled exclusive expression of specific genes." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82 (4): 1074–78.
- Tait-Kamradt, A. G., K. J. Turner, R. A. Kramer, Q. D. Elliott, S. J. Bostian, G. P. Thill, D. T. Rogers, a K. A. Bostian. 1986. „Reciprocal Regulation of the Tandemly Duplicated PHO5/PHO3 Gene Cluster within the Acid Phosphatase Multigene Family of Saccharomyces Cerevisiae". *Molecular and Cellular Biology* 6 (6): 1855–65.
- *Tang, Xinjing, Jinhao Zhang, Jingjing Sun, Yuan Wang, Junzhou Wu, a Lihe Zhang. 2013. „Caged Nucleotides/Nucleosides and Their Photochemical Biology". *Organic & Biomolecular Chemistry* 11 (45): 7814–24. <https://doi.org/10.1039/c3ob41735b>.
- Taslimi, Amir, Justin D. Vrana, Daniel Chen, Sofya Borinskaya, Bruce J. Mayer, Matthew J. Kennedy, a Chandra L. Tucker. 2014. „An optimized optogenetic clustering tool for probing protein interaction and function". *Nature communications* 5 (září): 4925. <https://doi.org/10.1038/ncomms5925>.
- Taslimi, Amir, Brian Zoltowski, Jose G. Miranda, Gopal Pathak, Robert M. Hughes, a Chandra L. Tucker. 2016. „Optimized second generation CRY2/CIB dimerizers and photoactivatable Cre recombinase". *Nature chemical biology* 12 (6): 425–30. <https://doi.org/10.1038/nchembio.2063>.
- Thomas, D, H Cherest, a Y Surdin-Kerjan. 1989. „Elements involved in S-adenosylmethionine-mediated regulation of the Saccharomyces cerevisiae MET25 gene." *Molecular and Cellular Biology* 9 (8): 3292–98.
- Tran, Mai Thi Nhu, Junko Tanaka, Michito Hamada, Yuka Sugiyama, Shota Sakaguchi, Megumi Nakamura, Satoru Takahashi, a Yoshihiro Miwa. 2014. „In Vivo Image Analysis Using IRFP Transgenic Mice". *Experimental Animals* 63 (3): 311–19.
- *Trendeleva, T. A., D. A. Aliverdieva, a R. A. Zvyagilskaya. 2014. „Mechanisms of Sensing and Adaptive Responses to Low Oxygen Conditions in Mammals and Yeasts". *Biochemistry. Biokhimiia* 79 (8): 750–60. <https://doi.org/10.1134/S0006297914080033>.
- Triezenberg, S. J., R. C. Kingsbury, a S. L. McKnight. 1988. „Functional Dissection of VP16, the Trans-Activator of Herpes Simplex Virus Immediate Early Gene Expression." *Genes & Development* 2 (6): 718–29. <https://doi.org/10.1101/gad.2.6.718>.
- Umino, Yumiko, Eduardo Solessio, a Robert B. Barlow. 2008. „Speed, Spatial, and Temporal Tuning of Rod and Cone Vision in Mouse". *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28 (1): 189–98. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3551-07.2008>.
- Wald, George. 1968. „The Molecular Basis of Visual Excitation". *Nature* 219 (5156): 800–807. <https://doi.org/10.1038/219800a0>.
- Wang, Wenjing, Craig P. Wildes, Tanyaporn Pattarabanjird, Mateo I. Sanchez, Gordon F. Glober, Gillian A. Matthews, Kay M. Tye, a Alice Y. Ting. 2017. „A Light- and Calcium-Gated Transcription Factor for Imaging and Manipulating Activated Neurons". *Nature Biotechnology* 35 (9): 864–71. <https://doi.org/10.1038/nbt.3909>.
- Wang, Xue, Xianjun Chen, a Yi Yang. 2012. „Spatiotemporal Control of Gene Expression by a Light-Switchable Transgene System". *Nature Methods* 9 (3): 266–69. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1892>.
- Wang, Yuting, Xinqin Jiang, Changxing Hu, Ting Sun, Zhiyong Zeng, Xiaoqi Cai, Hui Li, a Zhangli Hu. 2017. „Optogenetic Regulation of Artificial MicroRNA Improves H2 Production in Green Alga Chlamydomonas Reinhardtii". *Biotechnology for Biofuels* 10: 257. <https://doi.org/10.1186/s13068-017-0941-7>.
- West, R. W., S. M. Chen, H. Putz, G. Butler, a M. Banerjee. 1987. „GAL1-GAL10 Divergent Promoter Region of Saccharomyces Cerevisiae Contains Negative Control Elements in

- Addition to Functionally Separate and Possibly Overlapping Upstream Activating Sequences". *Genes & Development* 1 (10): 1118–31.
- Wieland, Markus, Marius Müller, Andreas Kyburz, Phillip Heissig, Sebastian Wekenmann, Franziska Stolz, Simon Ausländer, a Martin Fussenegger. 2014. „Engineered UV-A Light-Responsive Gene Expression System for Measuring Sun Cream Efficacy in Mammalian Cell Culture". *Journal of Biotechnology* 189 (listopad): 150–53. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2014.09.008>.
- Yang, Xiaojing, Anna Payne-Tobin Jost, Orion D. Weiner, a Chao Tang. 2013. „A Light-Inducible Organelle-Targeting System for Dynamically Activating and Inactivating Signaling in Budding Yeast". *Molecular Biology of the Cell* 24 (15): 2419–30. <https://doi.org/10.1091/mbc.E13-03-0126>.
- Yazawa, Masayuki, Amir M. Sadaghiani, Brian Hsueh, a Ricardo E. Dolmetsch. 2009. „Induction of Protein-Protein Interactions in Live Cells Using Light". *Nature Biotechnology* 27 (10): 941–45. <https://doi.org/10.1038/nbt.1569>.
- Ye, Haifeng, Marie Daoud-El Baba, Ren-Wang Peng, a Martin Fussenegger. 2011. „A Synthetic Optogenetic Transcription Device Enhances Blood-Glucose Homeostasis in Mice". *Science (New York, N.Y.)* 332 (6037): 1565–68. <https://doi.org/10.1126/science.1203535>.
- Yen, Kuangyu, Paul Gitsham, Jill Wishart, Stephen G. Oliver, a Nianshu Zhang. 2003. „An Improved TetO Promoter Replacement System for Regulating the Expression of Yeast Genes". *Yeast (Chichester, England)* 20 (15): 1255–62. <https://doi.org/10.1002/yea.1037>.
- Young, Douglas D., a Alexander Deiters. 2007a. „Photochemical Activation of Protein Expression in Bacterial Cells". *Angewandte Chemie (International Ed. in English)* 46 (23): 4290–92. <https://doi.org/10.1002/anie.200700057>.
- *Young DD, Deiters A 2007b. „Photochemical Control of Biological Processes". *Organic & Biomolecular Chemistry* 5 (7): 999–1005. <https://doi.org/10.1039/b616410m>.
- Yumerefendi, Hayretin, Daniel J. Dickinson, Hui Wang, Seth P. Zimmerman, James E. Bear, Bob Goldstein, Klaus Hahn, a Brian Kuhlman. 2015. „Control of Protein Activity and Cell Fate Specification via Light-Mediated Nuclear Translocation". *PLoS ONE* 10 (6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128443>.
- Zhang, Feng, Johannes Vierock, Ofer Yizhar, Lief E. Fenno, Satoshi Tsunoda, Arash Kianianmomeni, Matthias Prigge, a kol. 2011. „The Microbial Opsin Family of Optogenetic Tools". *Cell* 147 (7): 1446–57. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.12.004>.
- Zhao, Evan M., Yanfei Zhang, Justin Mehl, Helen Park, Makoto A. Lalwani, Jared E. Toettcher, a José L. Avalos. 2018. „Optogenetic Regulation of Engineered Cellular Metabolism for Microbial Chemical Production". *Nature* 555 (7698): 683–87. <https://doi.org/10.1038/nature26141>.

*sekundární citace