

Optogenetik und Biotechnologie

Lichtregulierte Genexpression

RALPH P. DIENSTHUBER, ROBERT OHLENDORF, TOBIAS GLEICHMANN, ROMAN SCHUBERT, ANDREAS MÖGLICH
INSTITUT FÜR BIOLOGIE, HU BERLIN

Sensory photoreceptors mediate vital organismal adaptations in response to light. Certain photoreceptors afford control by light over gene expression with minimal invasiveness, full reversibility, and high spatiotemporal resolution. The ability to precisely regulate in space and time the formation of arbitrary gene products now enables applications in optogenetics and biotechnology in both prokaryotic and eukaryotic hosts.

DOI: 10.1007/s12268-013-0286-0
© Springer-Verlag 2013

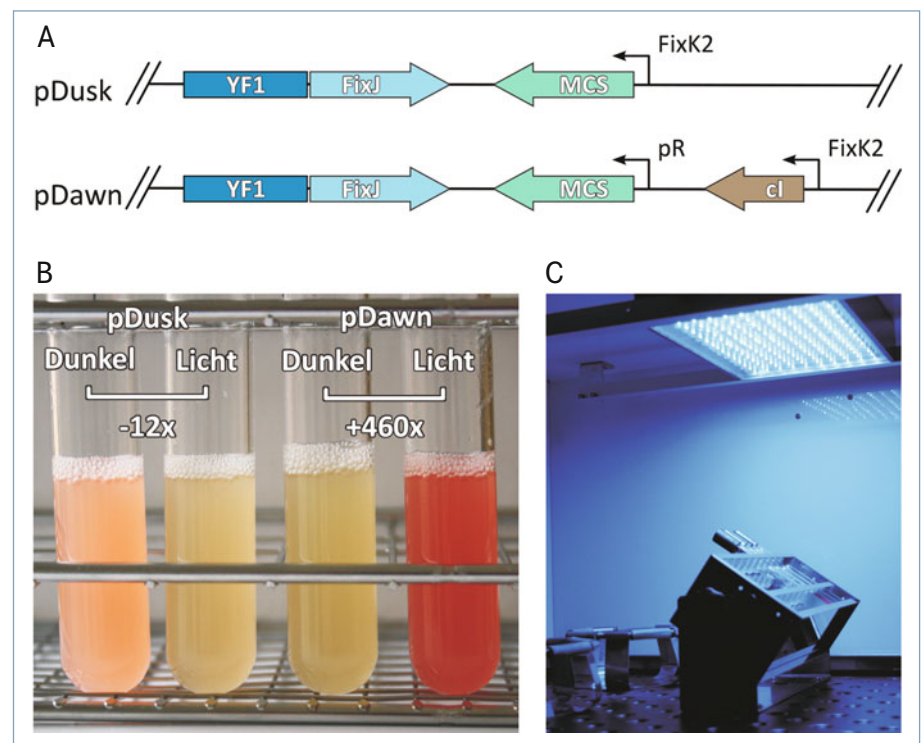
■ Licht dient über seine Rolle als primäre Energiequelle des Lebens hinaus zahlreichen Organismen als Quelle zeitlicher und räumlicher Information, auf deren Basis entscheidende Anpassungen von Verhalten, Entwicklung und Stoffwechsel erfolgen. Auf molekularer Ebene vermitteln sensorische Photorezeptorproteine, die Photosensor- und Effektormodule umfassen, die Wahrnehmung und Verarbeitung von Lichtreizen. Ein im Photosensor eingebetteter Chromophor (Farbstoffmolekül) absorbiert hierbei Photonen, was eine Serie reversibler, photochemischer Reaktionen – den Photozyklus – auslöst. Der Photosensor interagiert mit dem Effektor in lichtabhängiger Weise und steuert dadurch dessen biologische Aktivität, die beispielsweise enzymatischer oder transkriptioneller Natur sein kann. Aufgrund ihrer Photochemie unterteilen sich Photorezeptoren in mehrere Klassen [1]; so verwenden etwa LOV-Photorezeptoren (*light, oxygen, voltage*) Flavinnukleotide als Chromophore, um Licht im blauen Spektralbereich zu absorbieren, während Phytochrome mittels ihrer linearen Tetrapyrrol-Chromophore rotes und nah-infrarotes Licht detektieren. Häufig sind Photosensor- und Effektormodule voneinander abgegrenzte Proteindomänen, was bei der Erzeugung synthetischer Photorezeptoren mit neuartiger, lichtregulierter Funktion durch Rekombination von Photosensor- und Effektor-domänen ausgenutzt wird [2]. Seit einigen Jahren kommt Photorezeptoren eine zentrale Bedeutung im Forschungsfeld Optogenetik zu [3]. Dabei werden auf genetischem Wege Photorezeptoren in lebende Organismen einge-

schleust, in definierten Zellen exprimiert und dadurch die nicht-invasive, reversible Steuerung physiologischer Prozesse durch optische Methoden – Lichtbestrahlung – mit hoher räumlicher und zeitlicher Auflösung ermöglicht. Im Folgenden betrachten wir prokaryo-

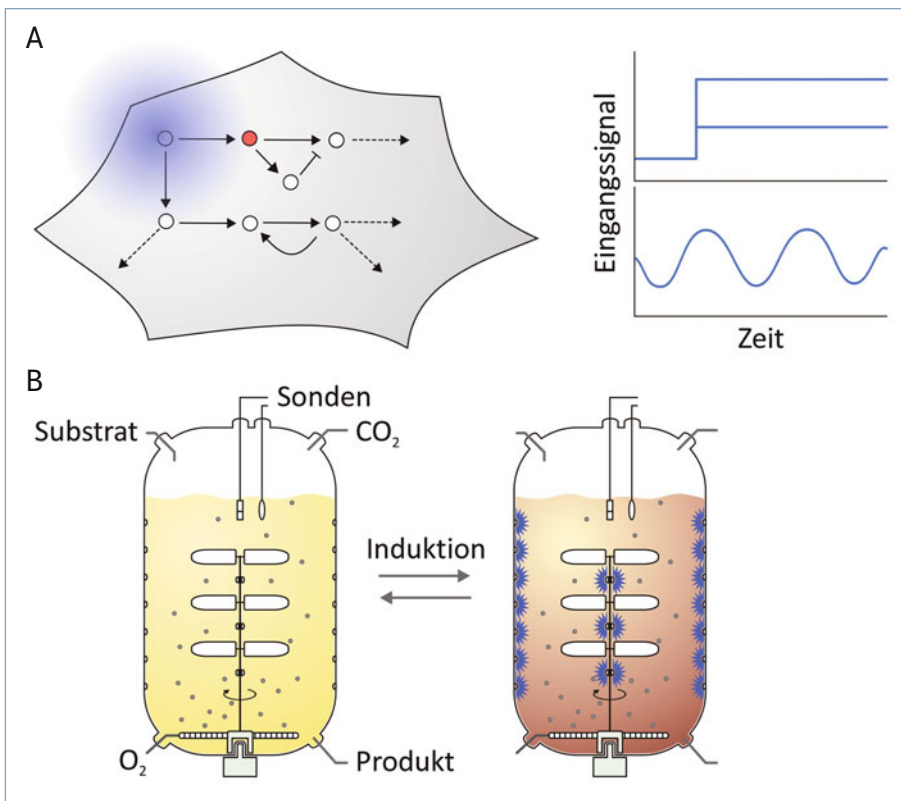
tische und eukaryotische Photorezeptoren zur lichtregulierten Expression von Genen und diskutieren mögliche Anwendungen in Optogenetik und Biotechnologie.

Lichtregulierte Genexpression in Prokaryoten

Obleich lichtvermittelte Anpassungen in Prokaryoten, etwa Phototaxis in Purpurbakterien [4], seit geraumer Zeit beschrieben sind, blieben die molekularen Hintergründe lange im Dunkeln. Erst die Identifikation zahlreicher Photorezeptoren, insbesondere in den vergangenen 20 Jahren, ermöglichte deren Charakterisierung und nachfolgenden Einsatz, unter anderem zur lichtregulierten Genexpression. Die Verwendung natürlicher



▲ **Abb. 1:** Lichtregulierte Genexpression mit den Plasmiden pDusk und pDawn. **A,** schematische Darstellung von pDusk und pDawn. Beliebige Gene können über eine *multiple cloning site* (MCS) eingeführt und lichtabhängig exprimiert werden. **B,** In pDusk wird die Expression des Fluoreszenzproteins DsRed in *E. coli* durch Blaulicht um den Faktor zwölf gemindert; in pDawn führt Blaulicht zu einer 460-fachen Steigerung der Expression. **C,** Beleuchtung eines Inkubatorschüttlers über 475-Nanometer-Leuchtdioden.



▲ **Abb. 2:** Einsatz lichtregulierter Genexpression in Optogenetik und Biotechnologie. **A,** Einzelne Knotenpunkte in Signaltransduktions-Netzwerken lassen sich über Licht zeitlich und räumlich genau ansteuern und untersuchen. **B,** Kontrolle von Fermentationsprozessen durch lichtregulierte Genexpression.

Photorezeptoren außerhalb ihres Ursprungsorganismus ist oft schwierig, da zahlreiche zusätzliche Proteine an der Lichtantwort beteiligt sind. Gegenwärtig wird die lichtregulierte Genexpression von synthetischen Photorezeptoren und Systemen beherrscht, die dieses Problem umgehen und somit vielseitig einsetzbar sind. So lässt sich die transkriptionelle Aktivität des Zwei-Komponenten-Systems EnvZ/OmpR aus *Escherichia coli* durch Rotlicht steuern, indem man das Sensormodul der EnvZ-Histidinkinase durch das Photosensormodul des cyanobakteriellen Phytochroms Cph1 ersetzt [5]. Im Licht ist die Expression von Zielgenen in *E. coli* um etwa den Faktor zehn gegenüber Dunkelbedingungen herabgesetzt. Allerdings erfordert dieses System die exogene Zugabe des Chromophors Phycocyanobilin (PCB) oder dessen endogene Produktion durch zwei zusätzlich einzuführende Enzyme.

Wir umgehen diese Einschränkung in zwei kürzlich entwickelten Systemen, die den synthetischen LOV-Photorezeptor YF1 und somit Flavinmononukleotid als Chromophor verwenden, das in den meisten Organismen vorkommt [6]. Bei YF1 handelt es sich um eine

durch Blaublicht gehemmte Histidinkinase, die auf dem Austausch des Sensormoduls der Histidinkinase FixL aus *Bradyrhizobium japonicum* gegen das LOV-Photosensormodul des YtvA-Proteins aus *Bacillus subtilis* beruht [7]. Gemeinsam mit dem Antwortregulator FixJ aus *B. japonicum* bildet YF1 ein Zwei-Komponenten-System, das die Expression über den zugehörigen FixK2-Promotor Blaublicht-abhängig steuert. Um den praktischen Einsatz zu erleichtern, haben wir alle Komponenten auf dem Plasmid pDusk vereinigt und um eine MCS (*multiple cloning site*) ergänzt, über welche die Expression beliebiger Gene durch Blaublicht gesteuert wird (**Abb. 1A**). Beispielsweise verringert sich die Expression des Fluoreszenzproteins DsRed in *E. coli* bis um den Faktor zwölf gegenüber Dunkelbedingungen (**Abb. 1B**). In dem aus pDusk abgeleiteten, komplementären Plasmid pDawn steuern YF1 und FixJ die Expression des Lambda-Repressors cI, der wiederum die Expression beliebiger Gene vom starken Lambda-Promotor pR unterbindet. In Summe ergibt sich eine Umkehr und Verstärkung des Signals: Während in pDusk Blaublicht die Expression herabsetzt, führt es in pDawn zu

einer bis zu 460-fachen Steigerung der Expression. Sowohl in pDusk als auch pDawn kann die Expression mit einer Auflösung von einigen Mikrometern räumlich kontrolliert und über Änderung der Lichtdosis variabel in ihrer Stärke eingestellt werden [6].

Lichtregulierte Genexpression in Eukaryoten

Die gegenwärtig effizientesten Ansätze lichtregulierter Genexpression in Eukaryoten beruhen allesamt auf Photorezeptoren, die bei Lichtbestrahlung Homo- oder Heterodimere bilden. Konzeptionell ähnlich dem Zwei-Hybrid-System wird die Kontrolle der Genexpression dadurch erzielt, dass mit entsprechenden Photorezeptoren gekoppelte Transkriptionsfaktoren über lichtvermittelte Dimerisierung an einen Promotor rekrutiert werden. Da eukaryotische Promotoren im Grundzustand inaktiv vorliegen [8], kommen hierbei ausnahmslos transkriptionelle Aktivatoren zum Einsatz. Ein erstes, auf pflanzlichen Phytochromen beruhendes System zeigt eine 1.000-fache Steigerung der Genexpression im Rotlicht, benötigt aber die Zugabe des Chromophors PCB, was eine weite Verbreitung dieses Systems hemmt [9]. Hingegen verwendet ein vielversprechender neuer Ansatz LOV-Photorezeptoren und kommt somit ohne Chromophorzugabe aus, ermöglicht aber dennoch eine etwa 300-fache Induktion der Expression nach Blaublicht-Bestrahlung [10]. Von besonderem Interesse sind zwei neue Systeme, welche die lichtvermittelte Aktivierung beliebiger, nativer Promotoren in eukaryotischen Genomen durch Verwendung von DNA-bindenden Zinkfinger- [11] oder *transcription-activator-like*-Proteinen (Feng Zhang, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, USA, persönliche Mitteilung) erlauben.

Einsatz in Optogenetik und Biotechnologie

Die räumliche und zeitliche Kontrolle der Bildung von Genprodukten über Licht eröffnet neuartige Anwendungen in Optogenetik und Biotechnologie. So können innerhalb von Signaltransduktions-Netzwerken einzelne Knotenpunkte in Raum und Zeit beliebig aktiviert oder deaktiviert werden, um Informationen über Verschaltung und Dynamik des Netzwerks zu erhalten (**Abb. 2A**). Ein weiteres Beispiel stellt die räumliche und zeitliche Untersuchung von Bakteriengemeinschaften und ihrer Kommunikation dar. Neben der Analyse bestehender Systeme können gezielt neue Schaltkreise und Organismen konstruiert wer-

den, die nach Lichtbestrahlung gewünschte Funktionen ausüben [12]. Über analytische Anwendungen hinaus ist der präparative Einsatz lichtregulierter Genexpression in biotechnologischen Produktionsverfahren denkbar (**Abb. 2B**). So konnten wir für die heterologe Proteinexpression zeigen, dass die Lichtinduktion vom pDawn-Plasmid der konventionellen Induktion über Zugabe chemischer Agenzien – etwa IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid) – ebenbürtig ist. Spezifische Vorteile lichtinduzierter Genexpression sind dabei leichte Automatisierbarkeit, variables Einstellen der gewünschten Expressionsniveaus über Beleuchtungsstärke und -dauer, mögliche Kostenersparnis sowie nicht-invasive, kontaminationsfreie Induktion.

Danksagung

Wir danken der Alexander von Humboldt-Stiftung und dem Bundesministerium für Bildung und Forschung für die Unterstützung durch einen Sofja-Kovalevskaja-Preis. ■

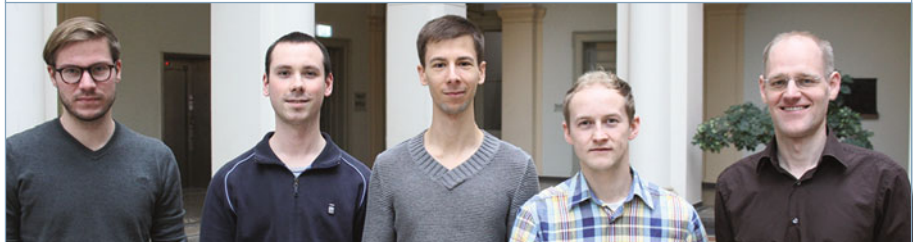
Literatur

- [1] Möglich A, Yang X, Ayers RA et al. (2010) Structure and function of plant photoreceptors. *Annu Rev Plant Biol* 61:21–47
- [2] Möglich A, Moffat K (2010) Engineered photoreceptors as novel optogenetic tools. *Photochem Photobiol Sci* 9:1286–1300
- [3] Deisseroth K (2011) Optogenetics. *Nat Methods* 8:26–29
- [4] Engelmann TW (1883) Bacterium photometricum. *Pflügers Arch* 30:95–124
- [5] Levsikaya A, Chevalier AA, Tabor JJ et al. (2005) Synthetic biology: engineering *Escherichia coli* to see light. *Nature* 438:441–442
- [6] Ohlendorf R, Vidavski RR, Eldar A et al. (2012) From dusk till dawn: one-plasmid systems for light-regulated gene expression. *J Mol Biol* 416:534–542
- [7] Möglich A, Ayers RA, Moffat K (2009) Design and signaling mechanism of light-regulated histidine kinases. *J Mol Biol* 385:1433–1444
- [8] Struhl K (1999) Fundamentally different logic of gene regulation in eukaryotes and prokaryotes. *Cell* 98:1–4
- [9] Shimizu-Sato S, Huq E, Tepperman JM et al. (2002) A light-switchable gene promoter system. *Nat Biotechnol* 20:1041–1044
- [10] Wang X, Chen X, Yang Y (2012) Spatiotemporal control of gene expression by a light-switchable transgene system. *Nat Methods* 9:266–269
- [11] Polstein LR, Gersbach CA (2012) Light-inducible spatiotemporal control of gene activation by customizable zinc finger transcription factors. *J Am Chem Soc* 134:16480–16483
- [12] Wang B, Buck M (2012) Customizing cell signaling using engineered genetic logic circuits. *Trends Microbiol* 20:376–384

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Andreas Möglich
 Institut für Biologie, Biophysikalische Chemie
 Humboldt-Universität zu Berlin
 Invalidenstraße 42
 D-10115 Berlin
 Tel.: 030-2093-8850
 Fax: 030-2093-8948
 andreas.moeglich@hu-berlin.de
 www.biologie.hu-berlin.de/gruppenseiten/
 biophyschem

AUTOREN



Robert Ohlendorf, Roman Schubert, Ralph P. Diensthuber, Tobias Gleichmann und Andreas Möglich (v. l. n. r.).

Robert Ohlendorf

2006–2009 Biologiestudium an der Universität Osnabrück. 2009–2011 Biophysikstudium an der Humboldt-Universität Berlin, dort seit 2011 Promotion in der Arbeitsgruppe Biophysikalische Chemie.

Roman Schubert

2003–2010 Biotechnologiestudium an der Universität Braunschweig. Seit 2010 Promotion in der Arbeitsgruppe Biophysikalische Chemie, HU Berlin.

Ralph P. Diensthuber

2000–2005 Biochemiestudium an der Universität Hannover. 2005–2009 Promotion an der Medizinischen Hochschule Hannover (MHH) in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. G. Tsiavaliaris. 2009–2011 Postdoc an der MHH in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. D. J. Manstein. Seit 2011 Postdoc in der Arbeitsgruppe Biophysikalische Chemie, HU Berlin.

Tobias Gleichmann

2007–2012 Biotechnologiestudium an der TU Berlin.

Andreas Möglich

1996–2001 Biochemiestudium an der Universität Regensburg. 2002–2005 Promotion am Biozentrum Basel, Schweiz, in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. T. Kiefhaber. 2006–2010 Postdoc an der University of Chicago, Illinois, USA, in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. K. Moffat. Seit 2010 Professor für Biophysikalische Chemie an der HU Berlin.

