

Synthetische Biologie

Induzierbare Promotoren für Cyanobakterien

ANNA BEHLE, ILKA M. AXMANN
SYNTHETISCHE MIKROBIOLOGIE, UNIVERSITÄT DÜSSELDORF

Cyanobacteria are versatile organisms with extreme phylogenetic diversity. With increasing need for alternative sustainable solutions, they are becoming increasingly attractive as production hosts in the biotechnology sector. Opposed to established heterotrophic model organisms, newer production hosts still require extensive characterization of standard biological parts in order to build complex networks and circuits. Here, we present examples of quantitative characterization of inducible promoters in the model organism *Synechocystis* sp. PCC 6803.

DOI: 10.1007/s12268-021-1624-2
© Die Autorinnen 2021

Das Gebiet der synthetischen Biologie hat in den letzten Jahrzehnten viel Aufmerksamkeit erlangt. Dabei lag der Schwerpunkt zunächst auf rationalem Design von genetischen Schaltkreisen und Systemen, deren Ausgabe präzise zu kontrollieren ist. Durch die kontinuierliche Entwicklung neuer Technologien im Bereich der Molekularbiologie verschob sich der Fokus immer weiter in Richtung großflächiger Screenings synthetischer Elemente. Inzwischen finden viele Konzepte der synthetischen Biologie auch in

der Biotechnologie Anwendung. Neben den bestehenden Modellorganismen wie *Escherichia coli* und *Saccharomyces cerevisiae*, welche bereits sehr gut charakterisiert sind und für die viele synthetische Module existieren, gewinnen immer mehr alternative Wirtsorganismen an Interesse. Zunehmend im Fokus stehen dabei Cyanobakterien, phototrophe Prokaryoten, die eine Vielzahl von Vorteilen bieten und sich zudem durch eine unglaubliche phylogenetische Vielfalt auszeichnen.

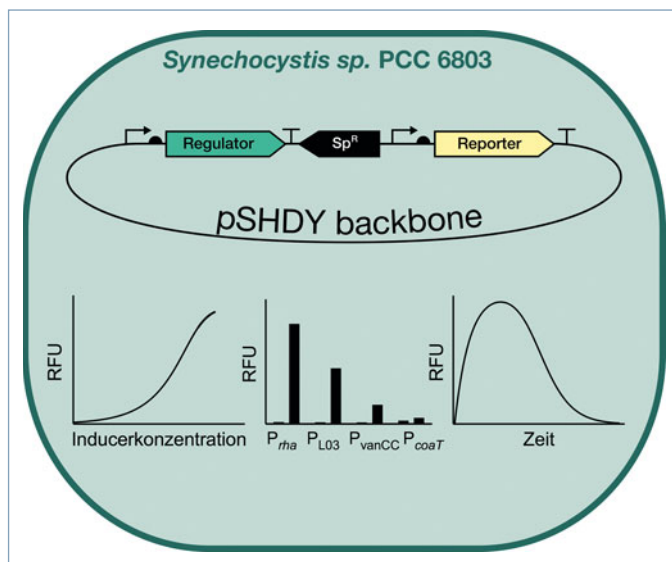
von genetischen Basismodulen. Hierzu zählen z. B. Fluoreszenzreporter und Affinitäts-tags, aber auch regulatorische Elemente, wie induzierbare oder konstitutive Promotoren. Ein Ziel unserer Arbeitsgruppe war es, Promotoren im cyanobakteriellen Modellorganismus *Synechocystis* sp. PCC 6803 zu testen und vergleichend zu charakterisieren, um sie für biotechnologischen Applikationen optimieren zu können.

Promotoren in Cyanobakterien: aktueller Stand

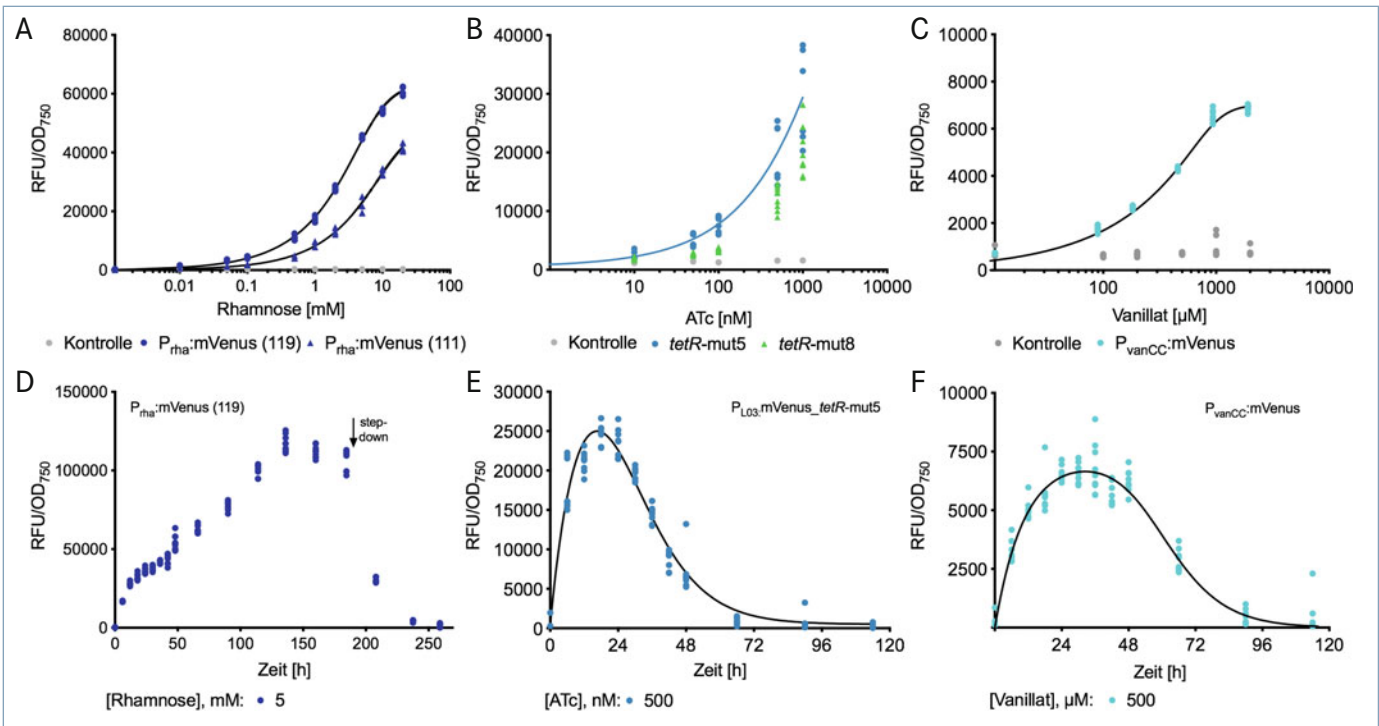
In den vergangenen Jahren wurden einige Systeme aus heterotrophen Organismen in Cyanobakterien getestet und für diese optimiert. Dazu gehört beispielsweise das CRISPR-Cas-System, welches sowohl für Genomediting als auch für kontrollierte Repression eingesetzt werden kann [1, 2]. Eine Herausforderung war es stets, die Expression des Regulators, also z. B. der Nuklease Cas9, so zu kontrollieren, dass sie weder zu stark noch zu schwach exprimiert wird. Eine nicht optimale Expression kann entweder zu einer fehlenden Regulation führen oder sogar zum Verlust der Lebensfähigkeit.

Induzierbare Promotoren sind ein essentielles Werkzeug, um die Expression eines Zielgens zu steuern. Je nach Einsatzgebiet kann es besonders von Vorteil sein, dass ein Promotor präzise titrierbar ist. Induzierbare Promotoren basieren grundlegend auf einem Promotorelement, welches dem regulierten Gen vorgeschaltet ist und spezifische Bindestellen besitzt, sowie einem regulierenden Transkriptionsfaktor, welcher entweder aktivierend oder reprimierend fungieren kann, indem er sich, abhängig von einem Inducermolekül, an die jeweiligen DNA-Bindestellen anlagert und so die Genexpression beeinflusst.

Eine der größten Herausforderungen bei der Etablierung von Cyanobakterien als neue Wirtsorganismen in der synthetischen Biologie und Biotechnologie ist die Entwicklung und funktionelle Charakterisierung



◀ **Abb. 1:** Vergleichende Charakterisierung der Dosis-Wirkungs-Dynamik von vier induzierbaren Promotorsystemen im Modell-Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. Oben: Schematische Darstellung des neuen bimodularen Reporterplasmids pSHDY. Pfeil: Promotor; Halbkreis: Ribosomenbindestelle; T: Terminator. Unten: Schematische Darstellung der hier untersuchten Aspekte Inducerdosis, Zeit und Vergleich mehrerer Promotoren.



▲ Abb. 2: Dosisabhängige und zeitliche Veränderung der Expressionsstärke von ausgewählten induzierbaren Promotoren in *Synechocystis* sp. PCC 6803. **A–C,** Induktion von P_{rha} , P_{L03} und P_{vanCC} in Abhängigkeit der Konzentration der respektiven Inducermoleküle, Rhamnose, Anhydrotetracyclin und Vanillin. In A und B markieren unterschiedliche Symbole unterschiedlich starke Expression der Transkriptionsfaktoren. Eine Autofluoreszenzkontrolle (in grau) wurde stets beigefügt. **D–F,** Entwicklung der Fluoreszenzantwort von P_{rha} , P_{L03} und P_{vanCC} über die Zeit, bei festgelegter Inducerkonzentration. Während bei P_{rha} die Fluoreszenz stets ansteigt und erst nach Auswaschen des Inducers (Pfeil) rapide abnimmt, zeigt sich für P_{L03} und P_{vanCC} ein rapider Anstieg und eine darauffolgende graduelle Abnahme des Signals.

Für Cyanobakterien herrscht derzeit ein Mangel an gut charakterisierten und robusten Werkzeugen. In vielen Fällen wird von nativen, metallinduzierbaren Promotoren Gebrauch gemacht. Der Nachteil der nativen Systeme ist jedoch ein relativ geringer Dynamikbereich sowie Toxizität bei höheren Metallkonzentrationen. Zudem wird durch Zugabe von Metallionen der globale Metabolismus der Zelle angesteuert. Ein solches, nicht orthogonales System ist für Applikationen der synthetischen Biologie wenig geeignet. Wir haben uns entschieden, zwei bereits erfolgreich verwendete synthetische sowie ein neues induzierbares System umfangreich und systematisch zu charakterisieren [3]. Dabei gehen wir im Folgenden auf drei Aspekte ein: I. konzentrationsabhängiges Verhalten, II. Verhalten über die Zeit, und III. systematischer Vergleich mit etablierten, konstitutiven Promotoren (**Abb. 1**).

Zeitliche und dosisabhängige Expression verschiedener Promotoren

Einige bekannte induzierbare Promotoren aus heterotrophen Organismen wurden bereits in Cyanobakterien getestet. Der

Rhamnose-induzierbare Promotor (P_{rha}) aus *E. coli* beispielsweise zeigte eine gute Leistung in Cyanobakterien [4]. Im Fall des *tet*-Promotors konnte eine komplett synthetische Sammlung mit verschiedenen Sequenzen erstellt und charakterisiert werden [5]. Der beste Kandidat dieser Sammlung, P_{L03} , wurde in unsere Analyse mit einbezogen. Neben diesen beiden etablierten, synthetischen Promotoren haben wir uns für einen Vanillin-induzierbaren Promotor (P_{vanCC}) entschieden, welcher im Vorfeld mittels gerichteter Evolution für *E. coli* optimiert wurde [6]. Um eine gute Vergleichbarkeit zwischen den charakterisierten Elementen zu gewährleisten, wurden alle getesteten Promotoren vor ein Fluorophoren, *yellow fluorescent protein* (YFP), geschaltet, das wiederum mit einem Degradationstag versehen wurde. Die Promotoraktivität konnte so mithilfe der Fluoreszenz gemessen werden, ohne dass eine zu hohe Stabilität des Fluoreszenzproteins das Ergebnis verfälschen könnte. Bei genauerer Untersuchung, wie sich die verschiedenen Systeme dosisabhängig verhalten, stellte sich heraus, dass alle drei Promotoren gut titrierbar sind, sich jedoch untereinander in ihrer relativen Stärke unterschieden

(**Abb. 2**). P_{rha} schnitt in dieser Hinsicht am besten ab, gefolgt von P_{L03} und schließlich P_{vanCC} . Bei P_{rha} und P_{L03} konnte gezeigt werden, dass sich die Expressionsstärke nicht nur in Abhängigkeit der Inducerdosis, sondern auch durch Veränderung der Expressionsstärke des regulierenden Transkriptionsfaktors modifizieren ließ.

Auch bei der zeitlichen Entwicklung des Fluoreszenzsignals zeigten sich deutliche Unterschiede (**Abb. 2**). Der P_{rha} Promotor reagierte mit einem stabilen Anstieg des Signals, welches nach sechs Tagen stagnierte. Um sicherzustellen, dass dieser Effekt Rhamnose-abhängig ist, wurde die Rhamnose aus dem Medium gewaschen, was in rapider Abnahme des Signals resultierte.

Im Vergleich dazu nahm das Signal von P_{L03} und P_{vanCC} zwar zunächst zu, verringerte sich jedoch nach einer gewissen Zeit wieder und kehrte zum Ausgangszustand zurück (**Abb. 2**). Dabei erinnert die Signalkurve stark an eine Halbwertskurve. Das Maximum ist bei P_{L03} etwa nach 24 h, bei P_{vanCC} nach etwa 48 h erreicht. Es konnte aber auch gezeigt werden, dass dieser Halbwerteffekt in beiden Fällen stark von der Zelldichte abhängt [3]. Für P_{L03} war eine Abnahme des

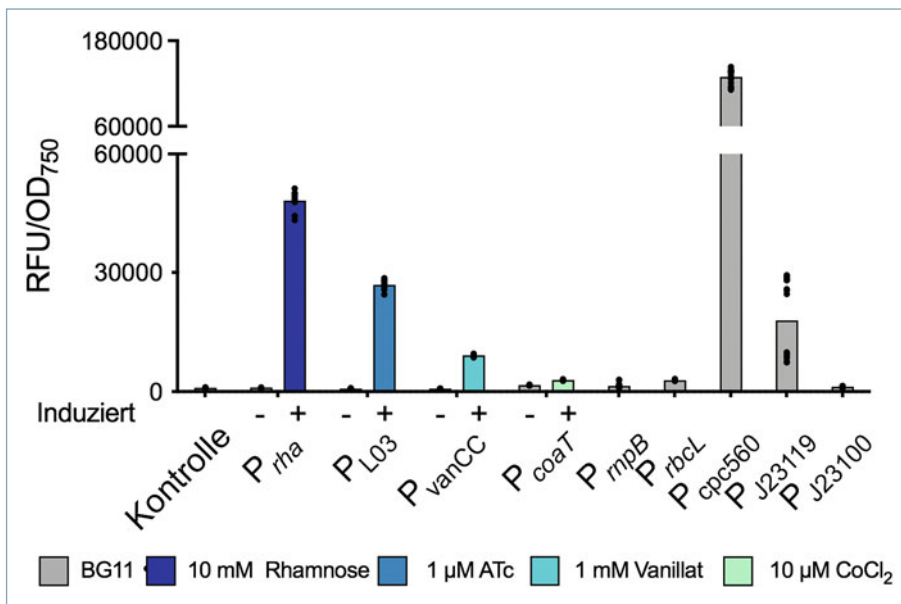


Abb. 3: Vergleich verschiedener Promotorsysteme in *Synechocystis* sp. PCC 6803. Neben einer Leervektorkontrolle (EVC) wurden vier induzierbare (P_{rha} , P_{L03} , P_{vanCC} , sowie der Kobalt-induzierbare Promotor P_{coaT}) mit fünf konstitutiven Systemen verglichen. Es wurden einige native Promotoren aus *Synechocystis* (P_{rnpB} , P_{rbcL} , P_{cpc560}) sowie zwei synthetische Minimalpromotoren (P_{J23119} , P_{J23100}) ausgewählt. BG11 bezeichnet die Kultivierung in cyanobakteriellem BG11-Medium ohne Zugabe von Inducer. Untereinander konnte ein breiter relativer Signalbereich abgedeckt werden

Signals zu erwarten, denn der Inducer, Anhydrotetracyclin, ist lichtsensitiv. Dass dies bei Vanillat auch der Fall ist, konnte widerlegt werden [3]. Dieses Ergebnis bleibt daher überraschend. Wir nehmen derzeit an, dass Vanillat von *Synechocystis* sp. PCC 6803 spezifisch oder unspezifisch verstoffwechselt werden kann. Trotz Inducerdegradation konnte gezeigt werden, dass das genetische Promotor-Regulator-Paar grundsätzlich in Cyanobakterien funktionsfähig ist.

Um die hier diskutierten Promotoren in einen weiteren wissenschaftlichen Kontext einzuordnen, wurden diese mit einer Reihe von häufig verwendeten konstitutiven Promotoren verglichen (Abb. 3). Das mit Abstand stärkste Signal zeigte dabei P_{cpc560} , ein lichtabhängiger Promotor. Im direkten Vergleich war P_{rha} am zweitstärksten, gefolgt von P_{L03} , sowie P_{J23119} , ein synthetischer

Minimalpromotor. Die weiteren getesteten Promotoren zeigten eher eine schwache Expression. Auffällig war der Kobalt-induzierbare Promotor P_{coaT} , der eine schwache Expression zeigte, aber bereits im uninduzierten Zustand aktiv war. Insgesamt lässt sich festhalten, dass mit den getesteten Promotoren ein breiter, relativer Signalbereich abgedeckt werden kann.

Um die Vergleichbarkeit wissenschaftlicher Ergebnisse voranzutreiben und die Gemeinschaft der cyanobakterieller Forschung weiter zu stärken, bereitet unser Institut derzeit eine Interlab-Studie vor. Dafür sollen verschiedene Promotorkandidaten in einem vergleichbaren Aufbau in verschiedenen Laboren vermessen werden. Interessierte können sich für weitere Informationen gern bei nicolas.schmelling@hhu.de melden.

Danksagung

Wir danken den Mitarbeiter:innen, die an diesem Projekt beteiligt waren, insbesondere Pia Saake, Anna Germann und Dennis Dienst, sowie unserer gesamten SynMiBi-Arbeitsgruppe für die Unterstützung. ■

Literatur

- [1] Yao L, Cengic I, Anfelt J et al. (2016) Multiple gene repression in cyanobacteria using CRISPRi. *ACS Synth Biol* 5: 207–212
- [2] Behler J, Vijay D, Hess W (2018) CRISPR-based technologies for metabolic engineering in cyanobacteria. *Trends Biotechnol* 36: 996–1010
- [3] Behle A, Saake P, Germann AT et al. (2020) Comparative dose-response analysis of inducible promoters in cyanobacteria. *ACS Synth Biol* 9: 843–855
- [4] Kelly C, Taylor GM, Hitchcock A et al. (2018) A rhamnose-inducible system for precise and temporal control of gene expression in cyanobacteria. *ACS Synth Biol* 7: 1056–1066
- [5] Huang HH, Lindblad P (2013) Wide-dynamic-range promoters engineered for cyanobacteria. *J Biol Eng* 7: 10
- [6] Meyer AJ, Segall-Shapiro TH, Glassey E et al. (2019) *Escherichia coli* “Marionette” strains with 12 highly optimized small-molecule sensors. *Nat Chem Biol* 15: 196–204

Funding note: Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.
Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.



Anna Behle (links) und Ilka M. Axmann

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Ilka Maria Axmann
 Universität Düsseldorf
 Institut für Synthetische Mikrobiologie
 Universitätsstraße 1
 D-40225 Düsseldorf
ilka.axmann@hhu.de