

Optogenetik

Zelluläre Lichtschalter für die Biotechnologie

LENA HOCHREIN

NACHWUCHSGRUPPE TAILOR, INSTITUT FÜR BIOCHEMIE UND BIOLOGIE,
UNIVERSITÄT POTSDAM

Optogenetics is an efficient method for controlling cellular processes in living organisms by light and a promising tool for biotechnology. Optogenetic switches can regulate the production of recombinant proteins or entire biosynthetic pathways in a reversible, time- and dose-dependent manner without influencing the cultivation condition. By combining light-driven regulation of native and heterologous genes, the growth and production phases of cells can be decoupled, maximizing product yield.

DOI: 10.1007/s12268-023-2033-5

© Die Autorin 2023

Die Optogenetik ist eine effiziente Methode, um zelluläre Prozesse in lebenden Organismen mithilfe von Licht zu steuern. Dafür werden aus lichtempfindlichen Organismen, wie beispielsweise Pflanzen oder Blaualgen, spezielle Genfunktionen kopiert und in Zellen eingebracht, die natürlicherweise nicht spezifisch auf Licht reagieren. Diese Zellen werden genetisch also so modifiziert, dass

zelluläre Funktionen an die eingebrachten lichtempfindlichen Proteine gekoppelt werden und diese durch Licht gezielt ein- oder ausgeschaltet werden können.

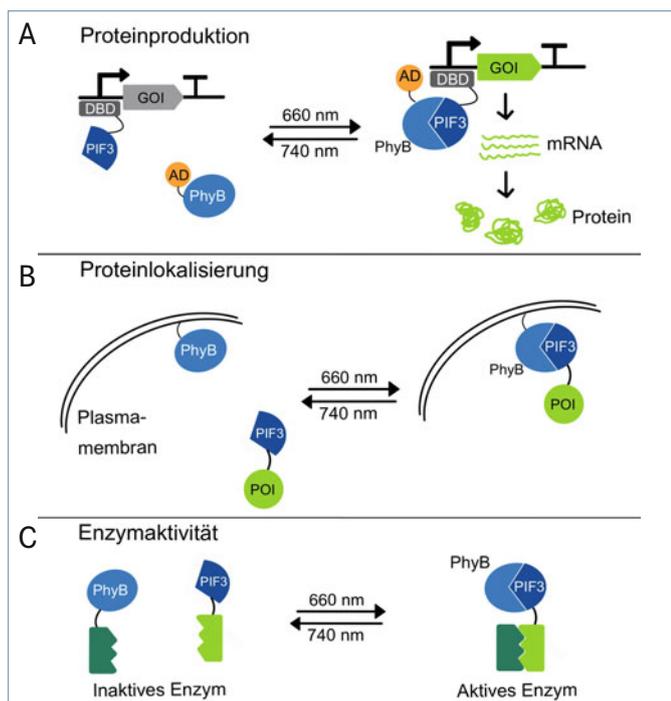
Während die Optogenetik ursprünglich als neurowissenschaftliches Instrument konzipiert war und hauptsächlich in humanen Zelllinien oder Säugetierzellen Anwendung fand [1], hat sich die Methode inzwischen auf

ein breites Anwendungsspektrum in der Biotechnologie ausgeweitet. Seitdem ein erstes, auf pflanzlichen Phytochromen basierendes System bereits vor 20 Jahren die Regulation der Proteinproduktion in der Bäckerhefe erlaubte [2], wurde eine Vielzahl an optogenetischen Schaltern entwickelt, die in biotechnologisch interessanten Mikroorganismen, wie Bakterien oder Hefen, aktiv sind. So haben sich Forschende bakterielle und pflanzliche Photorezeptoren, wie Phytochrome, Cryptochrome und Licht-Sauerstoff-Spannung-Domänen (LOV domain), zunutze gemacht. Diese Proteine ändern durch Licht einer spezifischen Wellenlänge ihre Konformation und ermöglichen die Bindung an einen Interaktionspartner. Auf diese Weise können verschiedene zelluläre Prozesse wie die Proteinproduktion (**Abb. 1A**), die subzelluläre Proteinlokalisierung (**Abb. 1B**) und die Proteinaktivität (**Abb. 1C**) durch Licht reguliert werden [3].

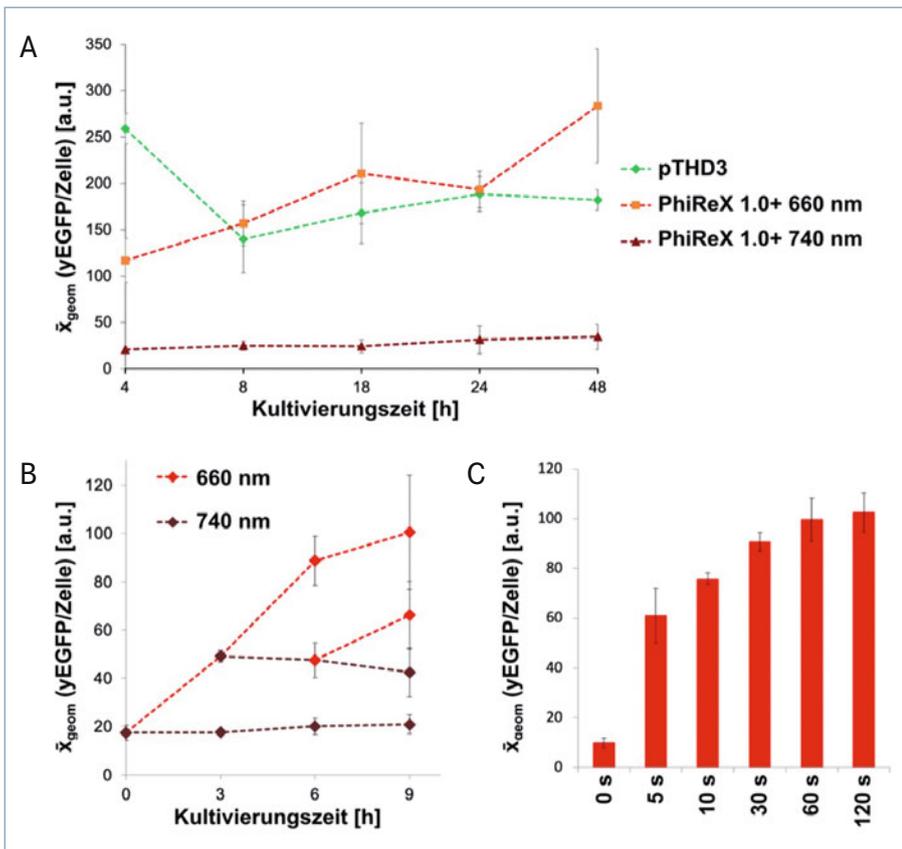
Lichtsensitive Schalter zur Steuerung der Proteinproduktion in Hefen

Die großtechnische Produktion rekombinanter Proteine für die Pharma- oder Nahrungsmittelindustrie ist von großer wirtschaftlicher Bedeutung. Hefen spielen dabei als Wirtsorganismen eine zunehmend größere Rolle, da sie robust und einfach kultivierbar sind, schnell wachsen und eine Vielzahl effizienter molekularbiologischer Techniken für ihre genetische Modifikation zur Verfügung steht. Während die Proteinproduktion normalerweise durch chemische Induktoren gesteuert wird, bieten optogenetische Schalter hier einige deutliche Vorteile:

- (1) Energieeffiziente LEDs bieten ein kostengünstiges und ungiftiges Induktionssystem.
- (2) Die Proteinproduktion kann durch Bestrahlung mit Licht verschiedener Wellenlängen mehrfach ein- und ausgeschaltet werden.
- (3) Produktlevel können durch eingestrahlte Lichtintensität und -menge gesteuert werden.
- (4) Eine Steuerung ist ohne Veränderung der Kultivierungsbedingungen, wie z. B.



◀ **Abb. 1:** Optogenetische Schalter zur reversiblen Steuerung zellulärer Prozesse basierend auf dem PhyB-PIF3 System. **A**, Ein Rotlicht-induzierbarer Transkriptionsfaktor steuert die Proteinproduktion. **B**, Lichtinduzierte Lokalisierung eines Proteins (POI) an der Plasmamembran. **C**, Kontrolle der Enzymaktivität durch Rotlicht.



▲ Abb. 2: Charakterisierung des PhiReX 1.0+-TFs. **A**, Zeitverlauf der lichtabhängigen Reporter-geninduktion im Vergleich zum starken nativen TDH3-Promotor. **B**, Reversible Regulation der Proteinproduktion. Uninduzierte Zellen wurden im Dunkeln kultiviert. Aktivierung der Genexpression: $\lambda = 660 \text{ nm}$, 30 s. Deaktivierung: $\lambda = 740 \text{ nm}$, 5 min. **C**, Abhängigkeit des Expressionsniveaus von der Lichtdosis.

Volumen, Zusammensetzung des Nährmediums oder Zelldichte, möglich.

- (5) Kurze Rotlicht-Pulse sind ausreichend für eine effiziente und langanhaltende Aktivierung.

Für die Entwicklung von optogenetischen Schaltern zur Steuerung der Proteinproduktion werden zweiteilige Transkriptionsfaktoren (TFs) an licht-sensitive Proteine fusioniert (**Abb. 1A**). Ein weit verbreitetes System ist hierbei der pflanzliche Photorezeptor PhyB, der nach Bestrahlung mit Rotlicht ($\lambda = 660 \text{ nm}$) seine Konformation ändert und die Bindung seines Interaktionspartners PIF3 ermöglicht. Durch Bestrahlung mit Licht einer größeren Wellenlänge ($\lambda = 740 \text{ nm}$) dissoziieren die Proteine wieder. Wenn man PhyB mit der Aktivierungsdomäne (AD) eines TFs und PIF3 mit einer DNA-Bindungsdomäne (DBD) fusioniert, bindet PIF3-DBD in nicht induzierten Bedingungen (Dunkelheit oder 740 nm) an seine Bindungsstelle im Promotor des zu regulierenden Gens (GOI). Die Stimulation mit rotem Licht ($\lambda = 660 \text{ nm}$) induziert die Dimerisie-

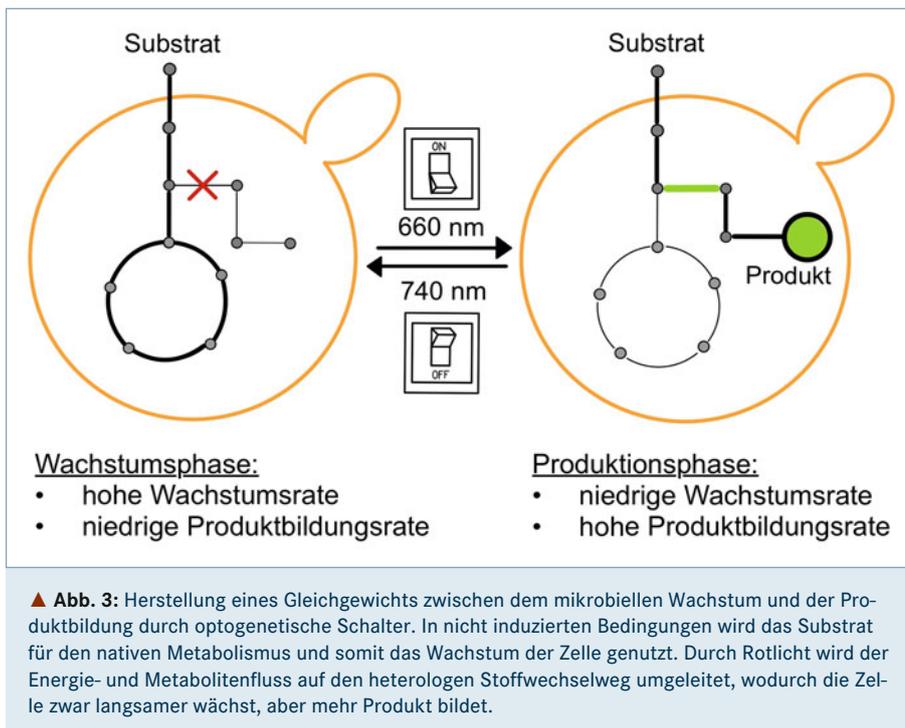
rung von PIF3-DBD mit PhyB-AD. Dadurch entsteht ein voll funktionsfähiger TF, der die Genexpression aktiviert, was in erhöhten mRNA- und Proteinmengen in der Zelle resultiert. So lässt sich die Transkription und die daraus resultierende Proteinproduktion durch Rotlicht aktivieren und durch Licht einer höheren Wellenlänge deaktivieren.

Während frühere Rotlicht-induzierbare TFs auf Basis des oben beschriebenen PhyB-PIF3-Systems native DNA-Bindungsdomänen nutzten [2, 4–6], entwickelte unser Labor das erste optogenetische System, das die DBD eines synthetischen TALE-Effektors (*transcription activator like effector*) verwendet [7]. Unser PhiReX-System zeigt sehr niedrige basale Expressionsniveaus in nicht induzierten Bedingungen und kann Promotoraktivitäten erreichen, die während einer 48-stündigen Kultivierung kontinuierlich vergleichbar mit sehr starken nativen Hefepromotoren sind (**Abb. 2A**). Die Produktion von Fremdproteinen kann effizient durch kurze Lichtpulse der Wellenlänge 660 nm bzw. 740 nm wiederholt an- und ausgeschal-

tet werden (**Abb. 2B**). Die Promotoraktivität und die daraus resultierenden Proteinmengen können in Abhängigkeit der applizierten Lichtdosis reguliert werden (**Abb. 2C**). Die Hefezellen des PhiReX 1.0+-Stamms wurden dabei gentechnisch so manipuliert, dass sie das Chromophor, welches als Ko-Faktor an PhyB bindet, selbst synthetisieren und somit unabhängig von externen Chemikalien sind. Ein von uns neu entwickelter PhiReX 2.0-TF basiert auf einem katalytisch inaktiven Cas9-Protein (dCas9) und kann durch einen einzigen Klonierungsschritt so programmiert werden, dass jedes native Gen des Hefegenoms flexibel angesteuert und hochreguliert werden kann [8]. In Ergänzung zu unserem PhiReX 2.0-System ermöglicht das dCas9-basierte Blaublicht-sensitive LINuS-System eine moderate Herunterregulierung von nativen Promotoraktivitäten [9]. Das Ausschalten der Proteinproduktion basierend auf Transkriptionsfaktoren stoppt zwar die weitere mRNA-Produktion, ist jedoch durch bereits in der Zelle vorhandenes Protein und mRNA träge, da diese unter normalen Bedingungen nicht sofort abgebaut werden. Daher wurden weitere optogenetische Systeme zur Kontrolle der RNA-Level [10] bzw. für den lichtinduzierten Proteinabbau [11] publiziert. Optogenetische Schalter können also die reversible Regulation einzelner Genfunktionen oder ganzer Stoffwechselwege ermöglichen, ohne teure oder toxische Chemikalien als Induktoren einsetzen zu müssen oder Kultivierungsbedingungen im Bioreaktor zu verändern. Somit kann die Proteinproduktion nicht nur präziser gesteuert, sondern auch nachhaltiger und günstiger umgesetzt werden.

Optimierung von Bioprocessen durch eine dynamische Entkopplung der Wachstums- und Produktionsphase

Die Produktion einzelner rekombinanter Proteine oder ganzer heterologer Biosynthesewege für die Herstellung von Biokraftstoffen, Biochemikalien, Arzneimitteln, Biomaterialien oder Lebens- und Futtermitteln ist eine enorme Belastung für den Wirtsorganismus. Da Ressourcen aus dem endogenen Stoffwechsel abgezogen werden, um den Fluss auf den nicht nativen Stoffwechselweg zu maximieren, kann es zu Wachstumsdefekten und damit verbundenen Produktionsverlusten kommen. Dieser Effekt wird noch verstärkt, wenn das Produkt oder das zu exprimierende Protein für die Wirtszelle toxisch ist. Eine Entkopplung der Wachstums- und Produk-



tionsphase von Zellen im Bioreaktor ist daher für die Optimierung der Produktausbeute unerlässlich.

Optogenetische Schalter bieten hier eine vielversprechende Möglichkeit, die Genexpression von nativen sowie Fremdgene reversibel und zeitabhängig zu regulieren und so die Bioproduktion mit der Wachstumsleistung der Wirtszelle in Einklang zu bringen. So können Zellen in Dunkelheit effizient bis zu einer gewünschten Zelldichte wachsen und anschließend durch Bestrahlung mit Licht einer spezifischen Wellenlänge in die Produktionsphase versetzt werden, indem der metabolische Fluss hin zu den heterologen Produkten verlegt wird. Somit fließt die zelluläre Energie nicht mehr in die Produktion nativer Metabolite, sondern wird für den heterologen Biosyntheseweg genutzt, wodurch die Produktausbeute erhöht wird (**Abb. 3**).

Eine große Herausforderung wird jedoch darin bestehen, die optogenetischen Werkzeuge so zu skalieren, dass eine robuste Feinabstimmung der Genexpressionsniveaus im großvolumigen Bioreaktoren möglich ist.

Danksagung

Ich danke dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) für die finanzielle Förderung meiner Nachwuchsgruppe TAILOR (FKZ 031B1390), meiner Arbeitsgruppe für hilfreiche wissenschaftliche Diskussionen und der Abteilung Molekularbiologie unter Leitung von Prof. Müller-Röber für die Unterstützung und Aufnahme meiner Nachwuchsgruppe.

Literatur

[1] Rost BR, Schneider-Warme F, Schmitz D et al. (2017) Optogenetic Tools for Subcellular Applications in Neuroscience. *Neuron* 96: 572–603

- [2] Shimizu-Sato S, Huq E, Tepperman J M et al. (2002) A Light-Switchable Gene Promoter System. *Nat Biotechnol* 20: 1041–1044
- [3] Figueroa D, Rojas V, Romero A et al. (2020) The Rise and Shine of Yeast Optogenetics. *Yeast* 38: 131–146
- [4] Hughes RM, Bolger S, Tapadia H et al. (2012) Light-Mediated Control of DNA Transcription in Yeast. *Methods* 58: 385–391
- [5] Kennedy MJ, Hughes RM, Peteya LA et al. (2010) Rapid Blue-Light-Mediated Induction of Protein Interactions in Living Cells. *Nat Methods* 7: 973–975
- [6] Sorokina O, Kapus A, Terecskei K et al. (2009) Switchable Light-Input, Light-Output System Modelled and Constructed in Yeast. *J Biol Eng* 3: 1–16
- [7] Hochrein L, Machens F, Messerschmidt K et al. (2017) PhiReX: A Programmable and Red Light-Regulated Protein Expression Switch for Yeast. *Nucleic Acids Res* 45: 9193–9205
- [8] Machens F, Ran G, Ruehmkorff C et al. (2023) PhiReX 2.0: A Programmable and Red Light-Regulated CRISPR-dCas9 System for the Activation of Endogenous Genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *ACS Synth Biol* 12: 1046–1057
- [9] Geller SH, Antwi EB, Di Ventura B et al. (2019) Optogenetic Repressors of Gene Expression in Yeasts Using Light-Controlled Nuclear Localization. *Cell Mol Bioeng* 12: 511–528
- [10] Blomeier T, Fischbach P, Koch LA et al. (2021) Blue Light-Operated CRISPR/Cas13b-Mediated mRNA Knockdown (Lockdown). *Adv Biol* 5: 2000307
- [11] Hasenjaeger S, Trauth J, Hepp S et al. (2019) Optogenetic Downregulation of Protein Levels with an Ultrasensitive Switch. *ACS Synth Biol* 8: 1026–1036

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>.



■ **Korrespondenzadresse:**
 Dr. Lena Hochrein
 Universität Potsdam
 Institut für Biochemie und Biologie
 Karl-Liebknecht-Straße 24–25
 D-14476 Potsdam
 hochrein@uni-potsdam.de