

Lichtgesteuerte Genexpression

Lichtschalter zur Kontrolle bakterieller Transkription und Translation

MARIUS BLACKHOLM, STEFANIE S. M. MEIER, ANDREAS MÖGLICH
FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE, CHEMIE & GEOWISSENSCHAFTEN, AG PHOTOBIOCHEMIE,
UNIVERSITÄT BAYREUTH

Given its crucial contribution to organismal development and adaptation, gene expression is subject to stringent regulation. With light as an inducer, reversible, noninvasive, spatiotemporally precise, and automatable expression control is reached. We advance circuits that target transcription or translation; respond to blue, red, or infra-red light; and afford pronounced regulatory responses. Alone or combined, these setups unlock innovative applications in fundamental and applied research.

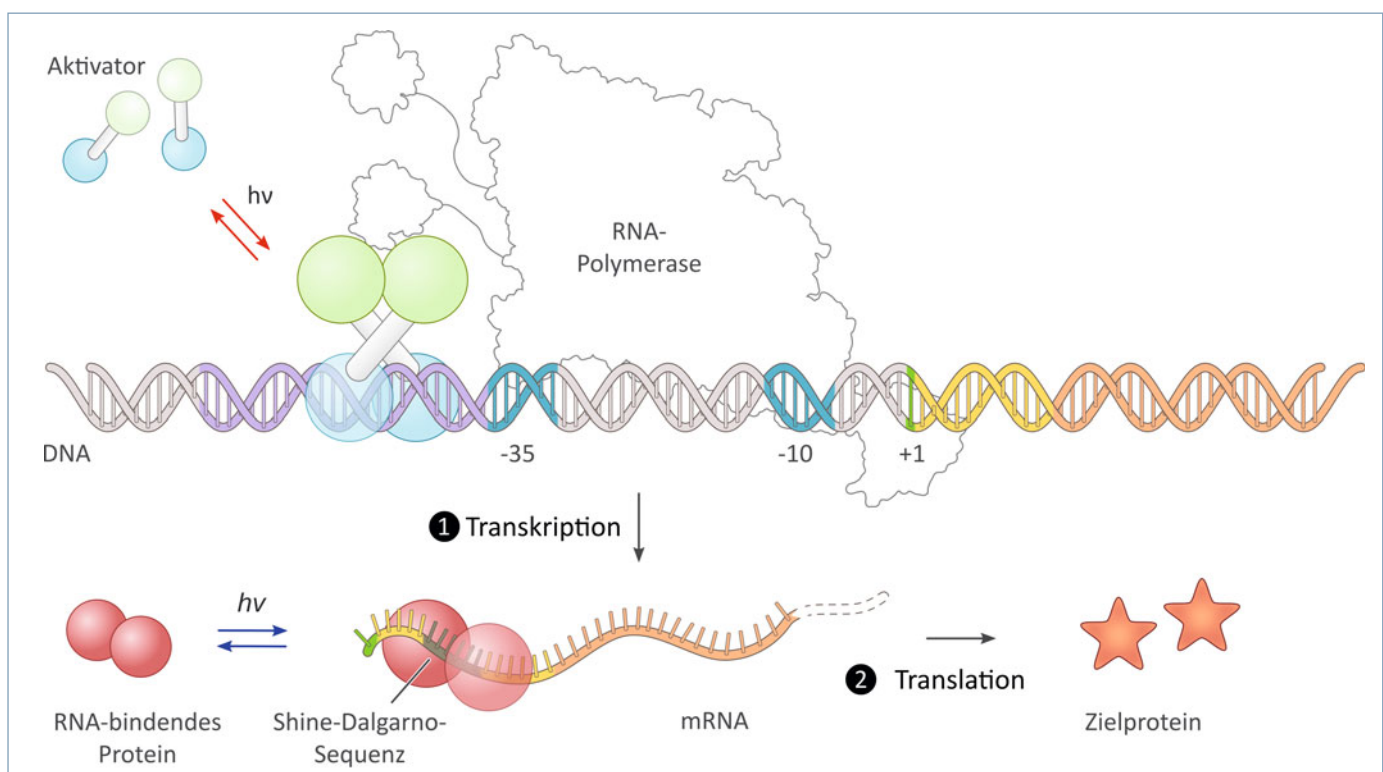
DOI: 10.1007/s12268-025-2443-7
© The Author(s) 2025

■ Entwicklung und physiologische Anpassungen von Organismen beruhen vielfach auf zeitlich veränderlicher, stringent regulierter

Genexpression. Differenzielle Genexpression kann sowohl durch Regulation auf transkriptioneller als auch translationaler Ebene

erzielt werden (**Abb. 1**). Die mechanistische Untersuchung entsprechender Vorgänge dient nicht nur einem besseren Verständnis organismischer Antworten, sondern ermöglicht auch den gezielten Einsatz in der grundlegenden und angewandten Forschung. Ein wichtiges und vertrautes Beispiel hierfür ist der Lac-Repressor, der bei Vorliegen passender Induktoren wie Lactose bzw. entsprechender Analoga die Transkription von Zielgenen freigibt und somit deren Expression auslöst.

Unser Hauptaugenmerk gilt indes Proteinen, die in ihrer genregulatorischen Wirkung abhängig von Licht sind und daher zu den sensorischen Photorezeptoren zählen [1]. Licht als Induktor der Genexpression weist einige Aspekte auf, die sich die Natur zunutze macht und die auch für Anwendungen in heterologen Zellen spannend sind. So durchdringt Licht lebendes Gewebe bis zu



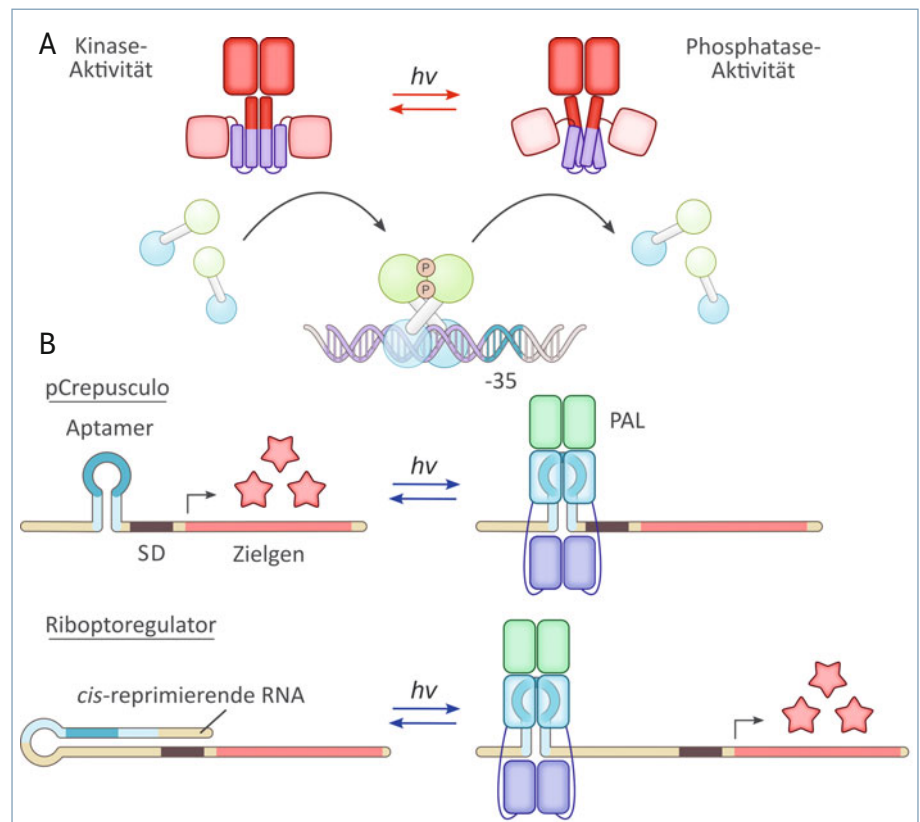
▲ **Abb. 1:** Beispiele lichtvermittelter Regulation der bakteriellen Genexpression [1]. Durch Rotlicht ($h\nu$) ausgelöst bindet ein Aktivator an die Promotorregion und rekrutiert die RNA-Polymerase, um die Transkription zu initiieren [5, 6]. Kontrolle kann auch auf Ebene der Translation durch Proteine, die unter Blaulicht RNA-Motive binden und dadurch die Shine-Dalgarno-Sequenz maskieren, erzielt werden [10, 12].

einem gewissen, von seiner Wellenlänge abhängigen Grad, ist leicht und stufenlos dosierbar und mit hoher Auflösung in Raum und Zeit an- und abschaltbar. Für den biotechnologischen Einsatz durch Licht kontrollierter Genexpression ist zudem von Interesse, dass die Beleuchtung und somit die Induktion automatisierbar sind und, je nach Fragestellung, kontinuierlich nachjustiert werden können [2].

Zweikomponentensysteme zur transkriptionellen Genregulation

Zweikomponentensysteme (TCS) sind modular aufgebaute Signaltransduktionssysteme aus Histidinkinase und Antwortregulator, die die Transkription bakterieller Gene regulieren (**Abb. 1** und **Abb. 2A**). Hierbei nimmt die Histidinkinase über ihr Sensormodul einen spezifischen Reiz wahr und phosphoryliert daraufhin ihren entsprechenden Antwortregulator, der an eine spezifische Operator-Sequenz bindet und so die Transkription initiiert [3]. Den meisten Histidinkinasen ist neben ihrer Kinase- auch eine Phosphatase-Aktivität eigen (**Abb. 2A**, [3]). Signalabhängige Anpassung der gegensätzlichen enzymatischen Reaktionen erlaubt die Phosphorylierung des Antwortregulators besonders genau zu steuern und somit die nachfolgende Genexpression überaus stringent zu regulieren [3]. Histidinkinasen weisen einen modularen Aufbau aus Sensor- und katalytisch aktiven Effektoreinheiten auf, der die Erzeugung künstlicher Rezeptoren durch Rekombination dieser Einheiten begünstigt [1]. Bereits vor einigen Jahren erzeugten wir nach diesem Rezept System, die die bakterielle Genexpression abhängig von Blaulicht kontrollieren [4] und seitdem breite Anwendung in der Synthetischen Biologie und Biotechnologie gefunden haben [1].

Den genannten modularen Aufbau ausnützend leiteten wir aus diesen Systemen unlängst neuartige ab, die statt auf blaues auf rotes Licht ansprechen [5, 6]. Als Sensoreinheiten kommen bakterielle Phytochrome zum Einsatz, die mittels Biliverdin Licht im rot- und fernroten Bereich wahrnehmen [3]. Auf molekularer Ebene löst die Absorption entsprechenden Lichts die Z/E-Isomerisierung einer Doppelbindung des Biliverdins aus. Durch Verwendung der Sensoreinheiten bakterieller Phytochrome gelang uns die Erstellung Rotlicht-regulierter Histidinkinasen [5, 6]. Nach Einbringung in ein TCS und Kodierung aller Bausteine auf einem einzelnen Plasmid kann auf diese Weise die



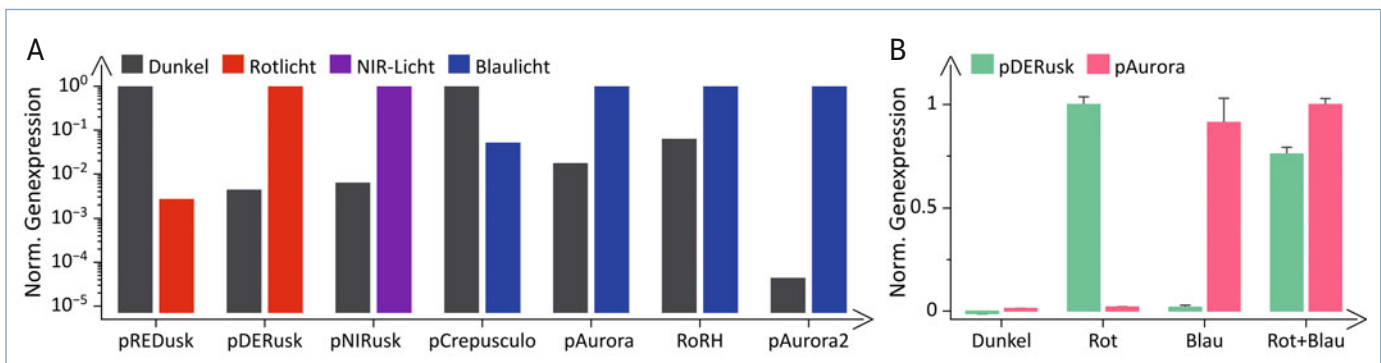
▲ **Abb. 2:** Kontrolle der Genexpression auf Ebene der Transkription und Translation. **A**, Die auf den Plasmiden pREDusk [5] und pDERusk [6] realisierten Zweikomponentensysteme vermitteln abhängig von Rotlicht die Phosphorylierung und Dephosphorylierung des Antwortregulators. Letzterer aktiviert in seinem phosphorylierten Zustand die Transkription an spezifischen Promotoren. **B**, Unter Blaulicht bindet der PAL-Rezeptor aus *Nakamurella multipartita* [9] spezifische RNA-Motive. Durch deren Einbettung in die 5'-untranslatierte Region von mRNAs kann mittels PAL die Expression auf Translationsebene durch Blaulicht kontrolliert werden [10, 12].

Expression von Zielgenen in *Escherichia coli* durch rotes Licht stringent kontrolliert werden.

Zunächst erstellten wir das pREDusk-System [5], das eine unerwartet ausgeprägte Antwort zeigt und die Genexpression unter Rotlicht stark absenkt (**Abb. 2A** und **Abb. 3A**). Jedoch verlangen Anwendungen vielfach nach einer lichtinduzierten Aktivierung der Genexpression statt einer Inhibition. Dem Rechnung tragend drehten wir zunächst die Antwort des Systems durch Einbringung einer genetischen Inversionskassette um, die als logischer NOT-Schalter fungiert und somit die Steigerung der Expression unter Rotlicht vermittelt [8]. Eine Aktivierung der Genexpression durch Rotlicht ließ sich aber auch auf deutlich elegantere Weise erzielen – mittels Variation des Linkers [3], der in der Histidinkinase die Sensor- und Effektoreinheiten verbindet. Obschon sowohl Sensor als auch Effektor unverändert blieben, konnten wir so Systeme mit durch Rotlicht aktivierbarer Genexpres-

sion etablieren, die wir ob der invertierten Antwort als pDERusk [6] bezeichnen (**Abb. 2A** und **Abb. 3A**).

Unsere Arbeiten identifizieren den Linker als zentrales Steuerelement der Signalleitung [6, 7], das mutmaßlich auch in natürlich vorkommenden Histidinkinasen ausgenutzt wird. Auf molekularer Ebene bestimmen die Beschaffenheit des Linkers und die Gegenwart des entsprechenden Signals das Gleichgewicht zwischen den genannten antagonistischen Kinase- und Phosphataseaktivitäten [3]. Dieses Gleichgewicht wird auch durch den Austausch einer Sensoreinheit gegen eine homologe andere ausgelenkt. Auf diese Weise erzielten wir Paare von Systemen, die in ähnlicher Weise lichtabhängig Genexpression regulieren, jedoch bis zu zehnfache Unterschiede in ihrer Lichtempfindlichkeit aufweisen [6]. Eine zusätzliche Erweiterung des Portfolios ergibt sich durch Einsatz von Bathyphytochromen [8], die durch nah-infrarotes statt rotes Licht aktiviert werden. Erneut den modularen Aufbau



▲ **Abb. 3:** Kontrolle der Genexpression in *Escherichia coli* durch verschiedene Lichtfarben. **A,** Gezeigt ist die im Dunkeln bzw. unter Licht verschiedener Farbe erzielte relative Genexpression für die im Artikel besprochenen Systeme [4–6, 10, 12]. Die Expression wurde durch Verwendung fluoreszierender Proteine bestimmt und auf den jeweiligen Maximalwert normiert. **B,** Einfache Kombination der Systeme pAurora [10] und pDERusk [6] erlaubt die unabhängige Kontrolle zweier Zielgene durch Blau- und Rotlicht.

ausnützend, erstellten wir in laufenden Arbeiten das pNIRusk-System, mittels dessen sich die bakterielle Genexpression stringent durch nah-infrarotes Licht aktivieren lässt (**Abb. 3A**).

Lichtaktiviertes RNA-bindendes Protein für mRNA-Kontrolle

Wie eingangs beschrieben, unterliegt die Genexpression auch einer Kontrolle auf Ebene der Translation neben der der Transkription. Eine gezielte lichtabhängige Regulation auf mRNA-Ebene ermöglicht der von uns im Actinobacterium *Nakamurella multipartita* entdeckte PAL-Photorezeptor [9]. PAL gehört der Klasse der *light-oxygen-voltage* (LOV)-Rezeptoren an, die über einen Flavinnukleotid-Kofaktor blaues Licht absorbieren und diesen Stimulus letztlich in Umlagerungen von Wasserstoffbrückenbindungen umsetzen [1]. Im PAL-Rezeptor wird auf diese Weise durch Licht die Affinität zu einer kurzen RNA-Haarnadelschleife, dem Aptamer, bis zu tausendfach erhöht [9, 10]. Die kompakte Größe des Aptamers erlaubt seine Einbringung in verschiedene andere RNA-Moleküle, um die vielseitige Kontrolle der Genexpression in Pro- und Eukaryoten zu erlauben. Beispielsweise lässt sich die bakterielle Expression von Zielgenen mittels PAL durch Blaulicht beeinflussen, indem man das Aptamer im Bereich der Ribosomen-Bindestelle einer mRNA platziert (**Abb. 2B** und **Abb. 3A**). Bindung von PAL an das Aptamer steht somit in Konkurrenz zur Erkennung der Shine-Dalgarno-Sequenz (SD) durch die 16S-rRNA der kleinen ribosomalen Untereinheit [9]. Wir realisierten dieses Konzept im pCrepusculo-Plasmid, das in *E. coli* die Herabsetzung der Expression des Zielgens unter Blaulicht vermittelt [10].

Obschon der Umfang der Lichtschaltbarkeit hinter dem der genannten, auf differenzieller Transkription beruhenden Systeme zurückbleibt, ist herauszustellen, dass in pCrepusculo die Regulation auf mRNA-Ebene umgesetzt ist. Dies erlaubt nicht zuletzt die Kombination mit Regulationsmechanismen, die auf DNA-Ebene wirken, um somit ihre Lichtantwort zu variieren und zu steigern. In einer ersten Demonstration dieses Konzepts kehrten wir die Lichtantwort von pCrepusculo durch Einbringung der oben genannten genetischen Inversionskassette um [10]. Im resultierenden pAurora-System induziert Blaulicht daher die Expression von Zielgenen und verstärkt den regulatorischen Effekt (**Abb. 3B**).

Inspiziert durch die Riboregulatoren [11] ergründeten wir anschließend, ob statt der kombinierten transkriptionellen und translationalen Kontrolle, wie sie in pAurora vorliegt, die Expression von Zielgenen mittels PAL allein auf mRNA-Ebene aktiviert werden kann [12]. Hierzu gestalteten wir die 5'-untranslatierte Region der mRNA im pCrepusculo-System derart um, dass die SD-Sequenz durch Ausbildung einer langen *cis*-repressorischen Haarnadelschleife blockiert und somit die Translation behindert wird (**Abb. 2B**). Lichtkontrolle wird in diesem als Riboptoregulator (RoR) bezeichneten Schaltkreis durch Einbringung des PAL-spezifischen Aptamers in die *cis*-repressorische Schleife erzielt. Die durch Blaulicht hervorgerufene Bindung von PAL an das Aptamer führt dann zu einer Ablösung der *cis*-repressorischen Schleife und gleichzeitiger Freilegung der SD-Sequenz. Die Translation wird daher initiiert und die Expression des Zielgens durch Blaulicht induziert (**Abb. 3A**). Alternativ kann der Riboptoregulator auch in

eine polycistronische mRNA eingebaut werden, um verschiedene Genprodukte, die vom selben Promotor transkribiert werden, unterschiedlich zu regulieren [12].

Da der Riboptoregulator ebenso wie pCrepusculo die lichtabhängige Regulation auf mRNA-Ebene erreicht, kann er gleichermaßen einfach in andere genregulatorische Schaltkreise eingebettet werden, um deren Lichtantwort zu modulieren und zu verbessern. Diesen Gedanken aufgreifend erstellten wir das pAurora2-Plasmid als Kombination des Riboptoregulators mit dem ursprünglichen pAurora-System [12]. In dem integrierten Schaltkreis induziert PAL die Expression von Zielgenen synergistisch auf zwei Pfaden, woraus sich eine ausgenommen stringente Kontrolle ergibt (**Abb. 3A**). Während im Dunkeln die basale Expression kaum detektierbar ist, induziert Blaulicht eine mehr als tausendfache Steigerung, was pAurora2 zu einem der Setups mit der größten Antwort macht.

Multimodale Kontrolle bakterieller Genexpression

Die obigen Ansätze bieten zahlreiche Möglichkeiten zur genauen Kontrolle der Proteinsynthese in Bakterien. Insbesondere erlaubt die Kombination zweier Systeme, die auf unterschiedliche Lichtfarben ansprechen, auch die zeitgleiche, unabhängige und aufeinander abgestimmte Expressionskontrolle zweier Zielgene [6, 12]. Diese Strategie ist einfach durch gemeinsames Einbringen der zugrunde liegenden Plasmide in eine Bakterienzelle umsetzbar. Die Kombination pAurora und pDERusk ermöglicht beispielsweise die differenzielle Expression zweier Zielgene durch Rot- oder Blaulicht (**Abb. 3B**). Für eine kompaktere Lösung können verschiedene Schaltkreise aber auch in einem

Plasmid vereinigt werden [12], ähnlich wie dies oben für pAurora2 ausgeführt ist.

Die vorgestellten und weitere, verwandte Systeme [1] ermöglichen, bakterielle Expression über Licht genau zu steuern, mit den daraus resultierenden, eingangs genannten Vorteilen. Über die Beantwortung von Fragestellungen der Grundlagenforschung hinaus scheinen die lichtregulierten Systeme gut geeignet für innovative Anwendungen in der Biotechnologie, perspektivisch auch im biomedizinischen Umfeld [1]. ■

Literatur

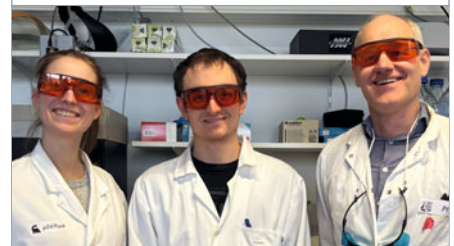
- [1] Ohlendorf R, Möglich A (2022) Light-regulated gene expression in Bacteria: Fundamentals, advances, and perspectives. *Front Bioeng Biotechnol* 10: 1029403
- [2] Milias-Argeitis A, Rullan M, Aoki SK et al. (2016) Automated optogenetic feedback control for precise and robust regulation of gene expression and cell growth. *Nat Commun* 7: 12546
- [3] Möglich A (2019) Signal transduction in photoreceptor histidine kinases. *Protein Science* 28: 1923–1946
- [4] 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
- [5] Multamäki E, García de Fuentes A, Sieryi O et al. (2022) Optogenetic Control of Bacterial Expression by Red Light. *ACS Synth Biol* 11: 3354–3367
- [6] Meier SSM, Multamäki E, Ranzani AT et al. (2024) Leveraging the histidine kinase-phosphatase duality to sculpt two-component signaling. *Nat Commun* 15: 4876
- [7] Ohlendorf R, Schumacher CH, Richter F, Möglich A (2016) Library-Aided Probing of Linker Determinants in Hybrid Photoreceptors. *ACS Synth Biol* 5: 1117–1126
- [8] Rottwinkel G, Oberpichler I, Lamparter T (2010) Bathy Phytochromes in Rhizobial Soil Bacteria. *J Bacteriol* 192: 5124–5133
- [9] Weber AM, Kaiser J, Ziegler T et al. (2019) A blue light receptor that mediates RNA binding and translational regulation. *Nat Chem Biol* 15: 1085–1092
- [10] Ranzani AT, Wehrmann M, Kaiser J et al. (2022) Light-Dependent Control of Bacterial Expression at the mRNA Level. *ACS Synth Biol* 11: 3482–3492
- [11] Isaacs FJ, Dwyer DJ, Ding C et al. (2004) Engineered riboregulators enable post-transcriptional control of gene expression. *Nat Biotechnol* 22: 841–847
- [12] Ranzani AT, Buchholz K, Blackholm M et al. (2024) Induction of bacterial expression at the mRNA level by light. *Nucleic Acids Research* 52: 10017–10028

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:

Prof. Dr. Andreas Möglich
 AG Photobiochemie
 Universität Bayreuth
 Universitätsstraße 30
 D-95447 Bayreuth
andreas.moeglich@uni-bayreuth.de

ARBEITSGRUPPE



Stefanie Meier, Marius Blackholm und Andreas Möglich (von links nach rechts) gehören der Arbeitsgruppe Photobiochemie an der Universität Bayreuth an. Schwerpunkte ihrer Forschung sind die mechanistische Untersuchung sensorischer Photorezeption und ihrer Anwendung zur lichtvermittelten Kontrolle biologischer Prozesse.