

Etablierung eines neuartigen genetischen Systems zur Aktivierung der Genexpression in Bakterien (MBFSt-Kennziffer 3381)

Dr. Fabian M. Commichau

*Institut für Mikrobiologie und Genetik, Abteilung für Allgemeine Mikrobiologie,
Georg-August-Universität Göttingen*

Abstract

Das Gram-positive Bakterium *Bacillus subtilis* wird sowohl in der Grundlagenforschung als auch für industrielle Anwendungen genutzt. In unserem Vorhaben haben wir ein System entwickelt, welches die induktorfremie Aktivierung der Genexpression in *B. subtilis* ermöglicht. Das System beruht auf der selektionsgetriebenen Aktivierung eines kryptischen Promotors, welcher die Expression von Genen für industrielle Anwendungen kontrolliert.

Einleitung

Das Gram-positive Bakterium *Bacillus subtilis* kommt in einer Vielzahl von Habitaten vor [1]. Durch die Fähigkeit zur Endosporen-Bildung kann das Bakterium auch extrem ungünstige Wachstumsbedingungen überdauern [2]. In der Grundlagenforschung ist *B. subtilis* zu einem Modellorganismus der Gram-positiven Bakterien geworden [3]. Da dem Bakterium der sogenannte „GRAS-Status“ erteilt wurde, wird es auch für industrielle Anwendungen genutzt [4-8]. In den vergangenen Jahren wurden zahlreiche Methoden sowohl für Methoden für biochemische Untersuchungen als auch für die Modifikation des Genoms entwickelt [9,10]. Darüber hinaus haben die Kenntnisse über die Regulation der Genexpression zweifellos dazu beigetragen, die Produktionsleistungen vieler genetisch modifizierter Stämme zu verbessern. Es ist bekannt, dass Populationen schnell wachsender Bakterien hohe Zelldichten erreichen können, und dass einige Zellen spontan entstandene Mutationen enthalten. Einige dieser Mutationen sind besonders dann von Bedeutung, wenn sie dem Bakterium unter bestimmten Wachstumsbedingungen einen Wachstumsvorteil liefern. DNA-Segmente, wie zum Beispiel direkte Sequenzwiederholungen haben die Eigenschaft sich besonders schnell zu verändern. Es ist bekannt, dass spontane Veränderungen von direkten Sequenzwiederholungen einen großen Einfluss auf das Potential eines Organismus haben, sich an unvorhergesehene Änderungen der Umweltbedingungen anzupassen, um somit das Überleben zu gewährleisten [11]. Einige Mikroorganismen können die intrinsische Instabilität von Sequenzwiederholungen auszunutzen, um Gene reversibel an und auszuschalten oder um die Genexpression zu modulieren [12-14]. In unserem Vorhaben haben wir ein genetisches System entwickelt, um die induktorfremie Aktivierung der Genexpression in *B. subtilis* zu ermöglichen. Das System beruht auf der selektionsgetriebenen Aktivierung eines kryptischen Promotors, welcher die Expression von Genen für industrielle Anwendungen kontrolliert.

Methodisches Vorgehen

Das neuartige System zur induktorfremien Aktivierung der Genexpression in *B. subtilis* basiert auf der spontanen Aktivierung eines kryptischen Kernpromotors und der selektionsgetriebenen Anreicherung von Bakterienzellen, welche die aktive Variante des Promotors enthalten (siehe Abbildung 1a). In dem kryptischen Promotor sind die beiden Bindestellen des sogenannten „Housekeeping-Sigmafaktors“ σ^A durch eine 9-basenpaarlange Sequenzwiederholung voneinander getrennt. Der kryptische Promotor ist mit einem Gen fusioniert, welches bei seiner Expression den Bakterienzellen einen selektiven Wachstumsvorteil liefert. Durch Justierung der Wachstumsbedingung, können solche Zellen angereichert werden, die den spontan aktivierten Promotors enthalten und das wachstumsfördernde Gen exprimieren. Für industrielle Anwendungen kann das wachstumsfördernde Gen zusammen mit weiteren Genen, welche für Enzyme nativer oder heterologer Stoffwechselwege kodieren fusioniert werden.

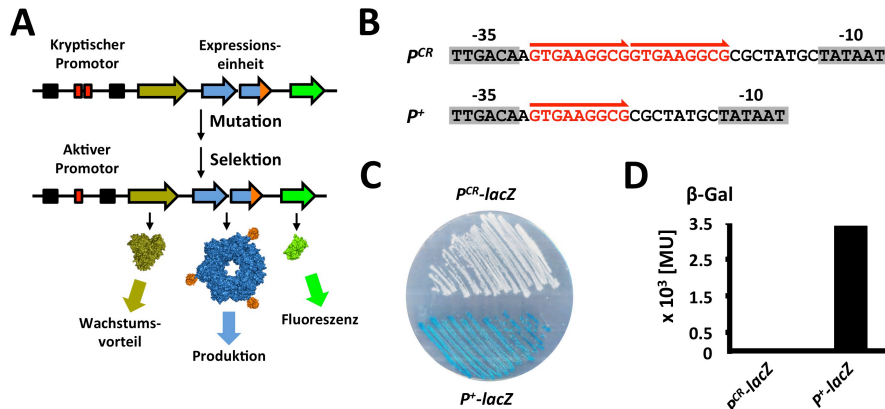


Abbildung 1. (A) Prinzip des induktorfreenen Expressionssystems. (B) DNA-Sequenzen der beiden konstruierten synthetischen Promotoren. (C) Aktivität der Promotoren beim Wachstum der Bakterien auf Agarplatten [16]. (D) Enzymassay zur Quantifizierung der Promotoraktivitäten [16].

Ergebnisse

Konstruktion und Evaluation eines kryptischen Kernpromotors

Die regulatorischen Elemente bakterieller Promotoren, wie zum Beispiel die -35- und -10- Regionen (TTGACA und TATAAT), welche durch den Sigmafaktor σ^A der RNA-Polymerase gebunden werden, sind gut untersucht worden [15]. Es ist daher sehr einfach synthetische Kernpromotoren zu konstruieren. Um einen inaktiven Promotor, der durch spontane Deletion einer Einheit einer Sequenzwiederholung aktiviert werden kann zu erhalten, wurde der Abstand zwischen den Bindestellen des Sigmafaktors σ^A in einem synthetischen Promotors vergrößert (Abbildung 1b). Der konstruierte Promotor wird im Folgenden als „ P^{CR} “ bezeichnet. Da der Abstand zwischen den -35- und -10-Regionen einen großen Einfluss auf die Promotoraktivität hat, war davon auszugehen, dass der kryptische P^{CR} -Promotor inaktiv ist. Tatsächlich konnten wir zeigen, dass der kryptische P^{CR} -Promotor im Gegensatz zum dem Promotor ohne Sequenzwiederholung (P^+) nicht funktional ist (Abbildung 1c-d).

Aktivierung der Genexpression durch Mutagenese und Selektion

Es ist bekannt, dass eine *rocG*-Mutante von *B. subtilis*, die die katabole Glutamat-Dehydrogenase (GDH) RocG nicht bilden kann, einen starken Wachstumsdefekt auf Vollmedium hat [12]. Der Wachstumsdefekt wird jedoch sehr schnell durch die Aktivierung des kryptischen *gudB^{CR}*-Gens aufgehoben. In den sogenannten Suppressor-Mutanten werden 9 Basenpaare einer 18-basenpaarlangen Sequenzwiederholung, welche sich in dem *gudB^{CR}*-Gen befindet, herausgeschnitten [17,18]. Die Bildung der funktionalen Glutamat-Dehydrogenase GudB liefert den Suppressor-Mutanten einen Wachstumsvorteil. Der Befund, dass die Sequenzwiederholung in dem *gudB^{CR}*-Gen sehr instabil ist, hat uns dazu verleitet ein System zur induktorfreenen Aktivierung der Genexpression in *B. subtilis* zu konstruieren. Das System beruht auf der Instabilität einer Sequenzwiederholung in einem synthetischen Promotor (P^{CR}). Um die Funktionalität des Systems zu demonstrieren, wurden drei unterschiedliche Stämme konstruiert (Abbildung 2a). In dem Kontrollstamm ist der inaktive P^{CR} -Promotor mit dem aktiven *gudB*-Gen fusioniert. In einem weiteren Stamm wurde zusätzlich das *gfp*-Gen eingebracht, um mittels Fluoreszenz-Mikroskopie die Aktivierung des Promotors verfolgen zu können. In dem dritten Stamm wurde das native *pdxST*-Operon zwischen das *gudB*-Gen und das *gfp*-Gen inseriert. Das *pdxT*-Gen wurde mit der Strep-Tag-DNA-Sequenz fusioniert, um den Enzymkomplex zu isolieren und die Funktionalität des Enzyms untersuchen zu können. Im letzten Schritt wurden neben dem *rocG*-Gen auch das *gudB*-Gen ausgeschaltet, um auf die spontante Aktivierung des kryptischen P^{CR} -Promotor selektieren zu können. Wie in Abbildung 2b zu erkennen ist, bilden alle drei Stämme spontan Suppressormutanten bei ihrem Wachstum auf Vollmedium. Die fluoreszenzmikroskopischen Analysen ergaben, dass die Suppressormutanten, welche das *gfp*-Gen enthalten, grün fluoreszieren (Abbildung 2b-c). Darüber hinaus konnten wir mittels Western-Blotting

zeigen, dass nach der „Dekryptifizierung“ des P^{CR} -Promotors die GDH GudB, das GFP-Protein und der PdxST-Enzymkomplex gebildet werden. Der Aktivitätsmessungen ergaben, dass der Enzymkomplex funktional ist und signifikante Mengen des B6-Vitamins Pyridoxal 5'-Phosphat bildet (Abbildung 2e-f).

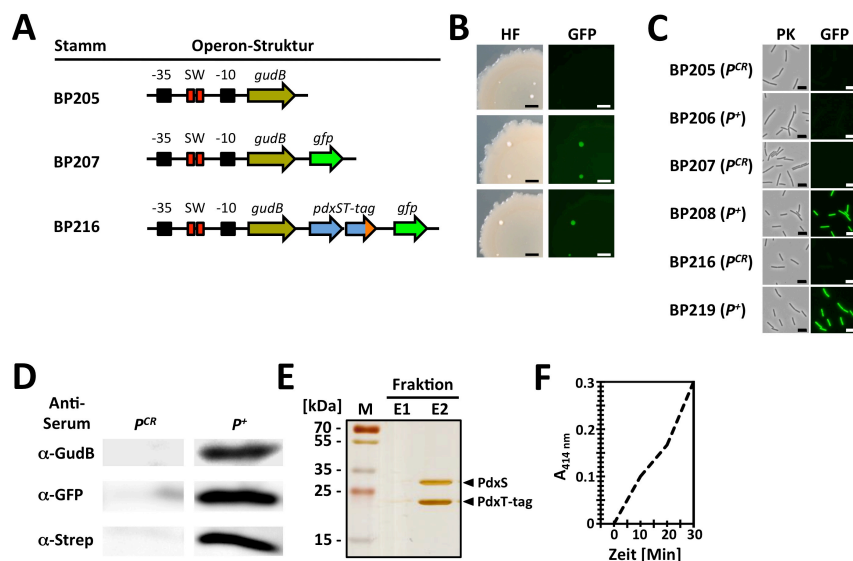


Abbildung 2. (A) Konstruierte Stämme und Operon-Strukturen. (B) Bildung von Suppressor-Mutanten. (C) Fluoreszenzmikroskopische Charakterisierung der Ausgangsstämme und der Suppressor-Mutanten. (D) Western-Blot-Analysen zum Nachweis der Protein-Bildung in den Suppressor-Mutanten. (E) Isolation des PdxST-Enzymkomplexes. Die Proteine wurden in einem Polyakrylamid-Gel aufgetrennt [16]. (F) Aktivitätsmessung mit dem PdxST-Enzymkomplex.

Fazit

Das entwickelte System kann dazu genutzt werden, um die Genexpression ohne Induktor zu aktivieren und um native Proteine in *B. subtilis* zu produzieren. Es ist bekannt, dass direkte Sequenzwiederholungen sowohl in prokaryotischen als auch in eukaryotischen Mikroorganismen instabil sind [11,13,19]. Das neuartige Expressionssystem kann daher auch auf andere Modellsysteme übertragen werden. Das Gen, welches bei seiner Expression der Zelle einen Wachstumsvorteil liefert ist durch andere Gene ersetzbar. Die Aktivierung der Genexpression durch spontane Mutagenese kann daher auch auf anderen Selektionsmedien erfolgen.

Literatur

- [1] Sonenshein *et al.* (2002). Washington, DC: American Society for Microbiology.
- [2] McKenney *et al.* (2013). Nat Rev Microbiol 11, 33-4.
- [3] Michna *et al.* (2014). Nucleic Acids Res 42: D692-8.
- [4] Commichau *et al.* (2014). Metab Eng 25, 38-49.
- [5] Commichau *et al.* (2015). Metab Eng 29, 196-207.
- [6] Manabe *et al.* (2013). Microb Cell Fact 12, 18.
- [7] Perkins *et al.* (1999). J Ind Microbiol Biotechnol 22, 8-18.
- [8] Schallmey *et al.* (2004). Can J Microbiol 50, 1-17.
- [9] Kumpfmüller *et al.* (2013). J Microbiol Methods 95, 350-2.
- [10] Herzberg *et al.* (2007). Proteomics 7, 4032-5.
- [11] Zhou *et al.* (2014). FEMS Microbiol Rev 38, 119-141.
- [12] Belitsky & Sonenshein (1998). J Bacteriol 180, 6298-6305.
- [13] Martin *et al.* (2005). Proc Natl Acad Sci U S A 102, 3800-3804.
- [14] Flores *et al.* (2013). Infect Immun 81, 4128-4138.
- [15] Blazeck & Alper (2013). Biotechnol J 8, 46-58.
- [16] Dormeyer *et al.* (2015). Microbiology 161, 354-361.
- [17] Gunka *et al.* (2012). J Bacteriol 194, 1036-1044.
- [18] Gunka *et al.* (2013). PLoS ONE 8, e66120.
- [19] Vincens *et al.* (2009). Science 324, 1213-6.