بسم اللّٰه الرحمن الرحيم

اپتوژنتیک و کاربرد آن در مهندسی متابولیسم سلولی

ارائه دهنده:

علیرضا جلالوند

دانشجوی دکتری تخصصی بیوتکنولوژی دارویی

انستیتو پاستور ایران

مقدمه‌ای بر اپتوژنتیک

تعریف اپتوژنتیک:

استفاده از نور برای اعمال نوعی دستور در سلول با تغییر ژنتیکی

عصب شناسان در پی نیاز به تحریک تنها یک سلول عصبی جهت مطالعه عملکرد آن سلول، تکنیک اپتوژنتیک را ابداع کردند.

گروهی از پروتئین‌های غشایی به نام اپسین‌ها که در پی برانگیختگی توسط نور، توانایی انتقال یون‌ها به داخل سلول را دارند در این تکینک برای تحریک سلول‌های عصبی خاصی به کار گرفته شدند.

doi:10.1038/nature26141

Optogenetic regulation of engineered cellular metabolism for microbial chemical production

Evan M. Zhao[1], Yanfei Zhang[1], Justin Mehl[1], Helen Park[1], Makoto A. Lalwani[1], Jared E. Toettcher[2] & José L. Avalos[1,3]

The optimization of engineered metabolic pathways requires careful control over the levels and timing of metabolic enzyme expression[1–4]. Optogenetic tools are ideal for achieving such precise control, as light can be applied and removed instantly without complex media changes. Here we show that light-controlled transcription can be used to enhance the biosynthesis of valuable products in engineered *Saccharomyces cerevisiae*. We introduce new optogenetic circuits to shift cells from a light-induced growth phase to a darkness-induced production phase, which allows us to control fermentation with only light. Furthermore, optogenetic control of engineered pathways enables a new mode of bioreactor operation using periodic light pulses to tune enzyme expression during the production phase of fermentation to increase yields. Using these advances, we control the mitochondrial isobutanol pathway to produce up to $8.49 \pm 0.31\ g\,l^{-1}$ of isobutanol and $2.38 \pm 0.06\ g\,l^{-1}$ of 2-methyl-1-butanol micro-aerobically from glucose. These results make a compelling case for the application of optogenetics to metabolic engineering for the production of valuable products.

Metabolic engineering aims to rewire the metabolism of organisms for efficient conversion of inexpensive substrates into valuable products such as chemicals, fuels, or drugs[1,2]. Fine-tuning the timing and levels of expression of enzymes involved in both natural and engineered pathways can relieve bottlenecks and minimize the metabolic burden of chemical production[3,4]. This is especially critical when the product of interest or its precursors are toxic, or when the biosynthetic pathway of interest competes with endogenous pathways that are essential for cell growth.

To address these challenges, metabolic engineers frequently use inducible systems to control metabolic enzyme expression[5–7] (see Supplementary Discussion). This approach makes it possible to separate bioreactor operation into two phases: a growth phase, during which product biosynthesis is repressed, and a production phase, when flux through the engineered pathway is maximized. Essential pathways that compete with product formation can be controlled with 'metabolic valves'—genetic programs that express essential enzymes during the growth phase to build biomass, and repress them during the production phase to redirect metabolism towards desired products[5,8].

Light is an attractive strategy to control gene expression in yeast for metabolic engineering applications. It is inexpensive and compatible with any carbon source or nutrient composition. Furthermore, light can be applied or removed instantaneously; this precise control over the level or duration of enzyme expression could simplify the screening of optimal proportions of metabolic pathway enzymes and enable new time-varying modes of control[9,10]. Light-switchable transcription modules have been shown to enable non-toxic, tunable gene expression in a variety of organisms[11,12], including yeast[11,13–15]. We thus sought to test whether optogenetics could be used to control rewired cellular metabolisms to overproduce valuable chemicals.

Here, we describe two powerful optogenetic gene expression systems for yeast, OptoEXP and OptoINVRT, based on the blue light-activated EL222 gene expression system[12]. Using these systems, we show that it is possible to activate and to repress distinct sets of genes in a light-dependent manner. We apply our approach to control endogenous and engineered metabolic pathways to define the growth and production phases of fermentation, enabling production of three valuable chemicals (lactate, isobutanol and 2-methyl-1-butanol (2-MBOH)), the biosyntheses of which directly compete with essential ethanol production. Using a time-varying illumination schedule, we achieve titres of $8.49 \pm 0.31\ g\,l^{-1}$ (mean ± s.d.) of isobutanol and $2.38 \pm 0.06\ g\,l^{-1}$ of 2-MBOH. Our results thus reveal that a simple technology—bidirectional light-controlled enzyme expression—offers a rich set of tools for metabolic engineering.

Our first goal was to construct bidirectional gene circuits in yeast to either induce or repress genes of interest with light. We used the EL222 optogenetic transcription system, which consists of a light-sensitive transcription factor from *Erythrobacter litoralis* (EL222) and its corresponding C120 promoter (P_{C120}), to drive the expression of a gene of interest[16–18] (Fig. 1a). The EL222 system is a robust and versatile gene expression platform, previously applied in *Escherichia coli*, mammalian cells and zebrafish[12,19,20]. We first constructed a yeast strain, YEZ139, in which expression of VP16–EL222 (a fusion of EL222 with the transcriptional activation domain of VP16 and a nuclear localization signal) was driven by the strong constitutive promoter of *PGK1* (P_{PGK1}) (P_{PGK1}–VP16–EL222) and expression of green fluorescent protein (GFP) was driven by the P_{C120} promoter (P_{C120}–GFP; see Methods, Supplementary Tables 1, 2, Extended Data Fig. 1). We called this system (and variants with different promoters driving EL222) OptoEXP.

OptoEXP enables strong and titratable light-inducible gene expression. In both glucose and glycerol media, cells with OptoEXP controlling GFP expression show a 43-fold increase in GFP expression when exposed to constant light compared to cells incubated in the dark, whereas intermittent light pulses produce intermediate expression levels (Fig. 1b, Extended Data Fig. 2). We found that all light sources used were sufficiently bright to activate the EL222 system maximally; thus, varying duty cycle was a reliable and reproducible method for achieving intermediate gene expression output (Extended Data Fig. 3, Methods). The maximum activation levels of OptoEXP are comparable to those reached by the *ADH1* promoter (P_{ADH1}), a constitutive promoter commonly used in metabolic engineering (Fig. 1c).

To construct a light-repressible gene circuit, we inverted the response of the OptoEXP system in a manner akin to the NOT logic gate used in digital processes. We harnessed the yeast galactose (GAL) regulon[21], in which Gal80 binds to and inhibits the Gal4 transcription factor, blocking its ability to induce expression from the *GAL1* promoter (P_{GAL1}). We reasoned that engineering yeast cells with constitutive expression of *GAL4* and *GAL80* expression under the control of VP16–EL222 would lead to constitutive expression from

[1]Department of Chemical and Biological Engineering, Hoyt Laboratory, Princeton University, 25 William Street, Princeton, New Jersey 08544, USA. [2]Department of Molecular Biology, 140 Lewis Thomas Laboratory, Washington Road, Princeton, New Jersey 08544, USA. [3]The Andlinger Center for Energy and the Environment, Princeton University, 86 Olden Street, Princeton, New Jersey 08544, USA.

© 2018 Macmillan Publishers Limited, part of Springer Nature. All rights reserved.

مقدمه

- بهینه سازی مهندسی متابولیسم سلولی، نیازمند کنترل دقیق و مداوم بیان آنزیم های متابولیکی
- اپتوژنتیک یک ابزار ایده آل برای رسیدن به دقت بالای کنترل بیان آنزیمی
- توانایی نور در کنترل دقیق و سریع بیان آنزیمی

یک اصل کلی در مهندسی متابولیسم:

توانایی رقابت مسیر مهندسی شده با مسیرهای طبیعی درون زاد سلولی

دلایل و مزایای استفاده از اپتوژنتیک جهت القای بیان ژن بجای القا کننده های شیمیایی

- غیر سمی بودن نور برای سلول
- سازگاری با منابع کربنی مختلف محیط کشت
- سریع الاثر بودن نور برای القا
- امکان حذف سریع نور جهت مهار القا
- استفاده در طیف بسیار وسیعی از ارگانیسم ها

هدف و رویکرد مطالعه

- نشان دادن افزایش تولید ماده های شیمیایی با ارزش در ساکارومیسس سرویزیه توسط فاکتور نسخه برداری کنترل شونده با نور

- این امکان وجود دارد که در یک حالت وابسته به نور دسته های ژنی مجزا می توانند فعال یا سرکوب شوند.

- رویکرد این مطالعه مبتنی بر تولید سه ماده ارزشمند لاکتات، ایزوبوتانول و ۲- متیل ۱- بوتانول توسط مسیر مهندسی شده در رقابت مستقیم با مسیر ضروری درون زاد تولید اتانول می باشد.

دو سیستم بیان ژن اپتوژنتیکی

OptoINVRT

OptoEXP

OPTOEXP

ساخت سازه ژنی PGK1-EL222-VP16-NLS در سویه YEZ139

تولید فاکتور نسخه برداری وابسته به نور EL222 در سویه مورد نظر

ساخت سازه ژنی Pc120-GFP

تولید پروتئین GFP در اثر نوردهی به فاکتور نسخه برداری EL222 و اتصال آن به پروموتر C120

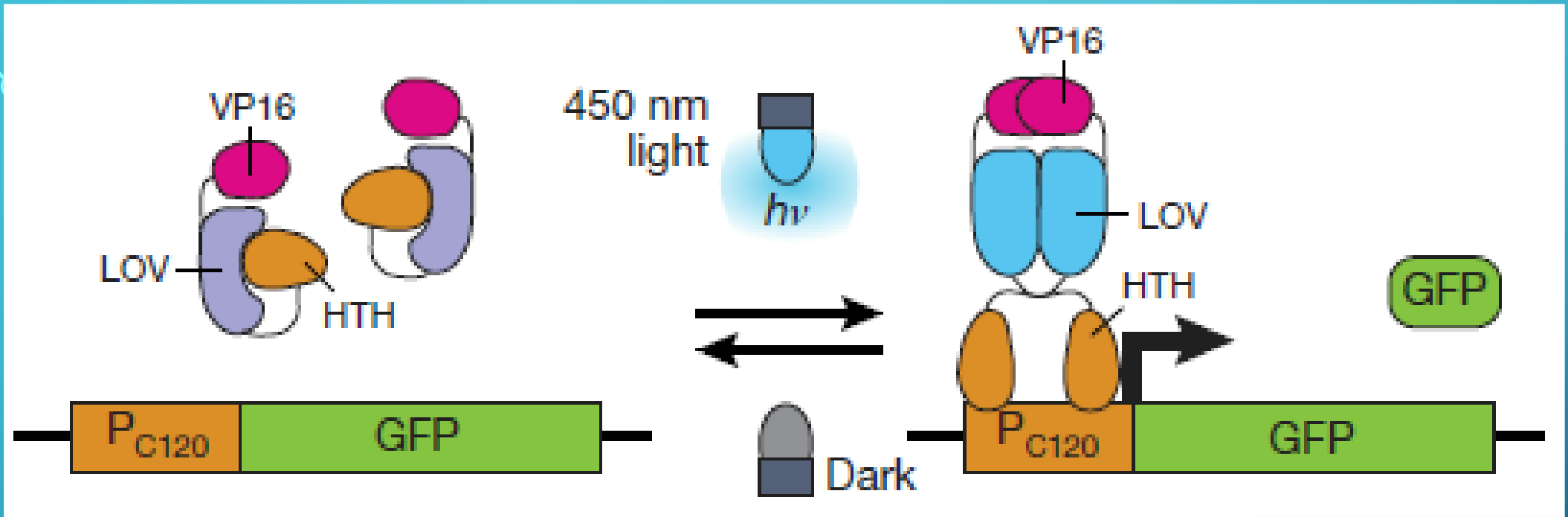
تأیید عملکرد سیستم اپتوژنتیکی OptoEXP و تولید ۴۳ برابری پروتئین GFP در مقایسه با حالت تاریکی

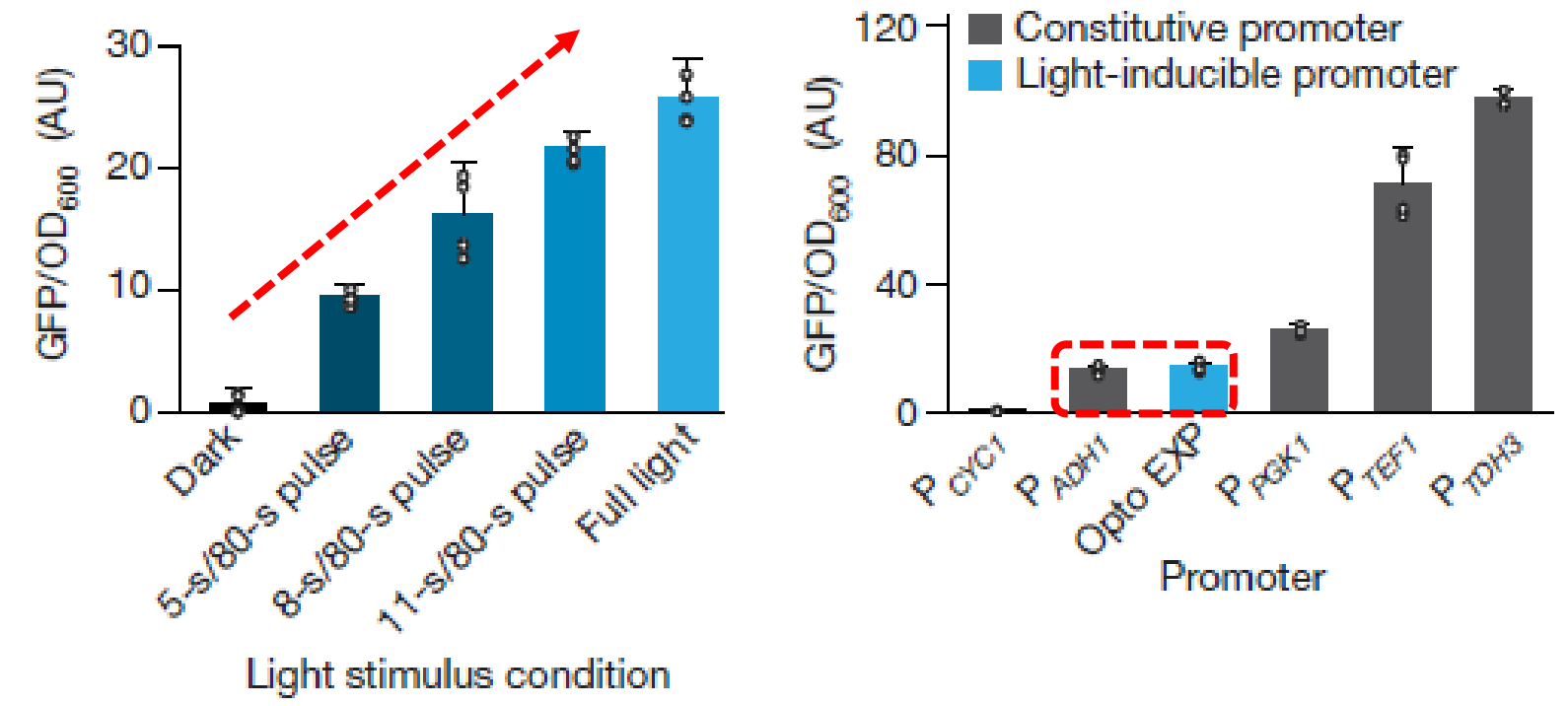
PGK1: نوعی پروموتور دائمی قوی

EL222: فاکتور نسخه برداری وابسته به نور در اریتروباکتر لیتورالیس که به پروموتور C120 متصل می‌شود.

VP16: دومن فعالسازی رونویسی با عمل دایمریزاسیون

NLS: سیگنال هسته‌ای


VP16
LOV
HTH
450 nm light
hν
Dark
VP16
LOV
HTH
GFP
P C120
GFP
P C120
GFP

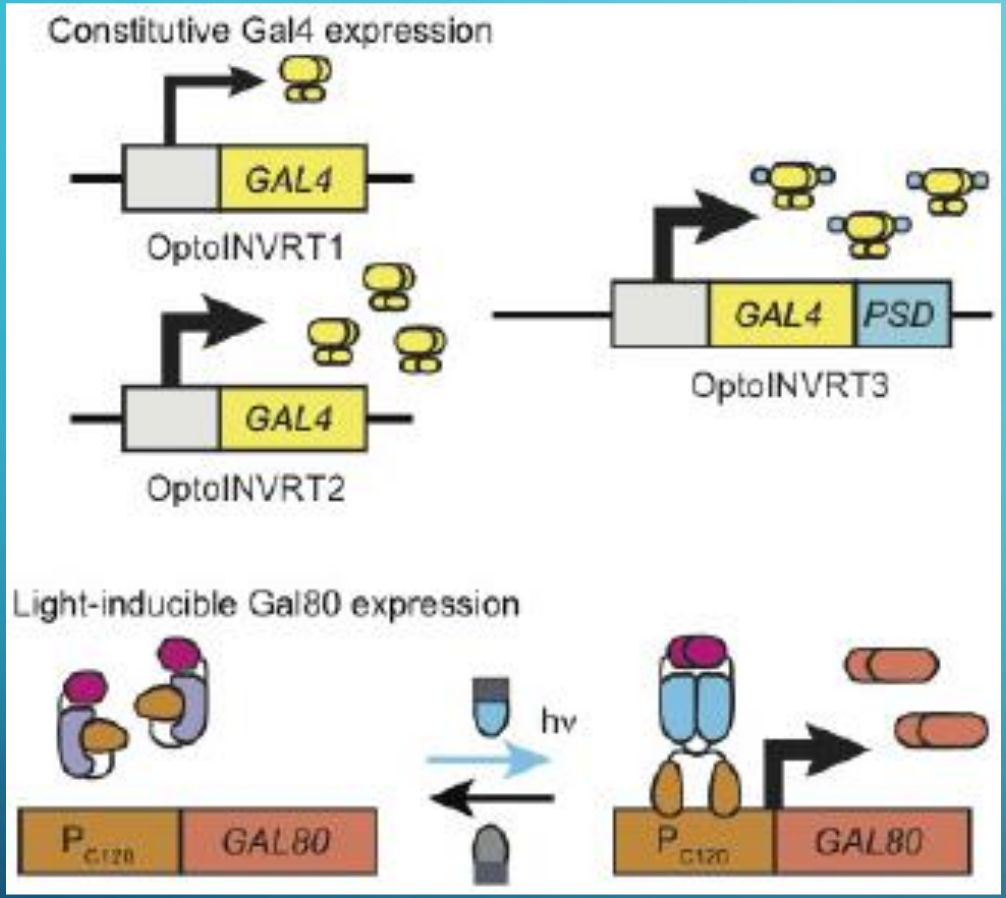

GFP/OD600 (AU)
30
20
10
0
Dark
5-s/80-s pulse
8-s/80-s pulse
11-s/80-s pulse
Full light
Light stimulus condition
120
80
40
0
Constitutive promoter
Light-inducible promoter
P CYC1
P ADH1
Opto EXP
P PGK1
P TEF1
P TDH3
Promoter

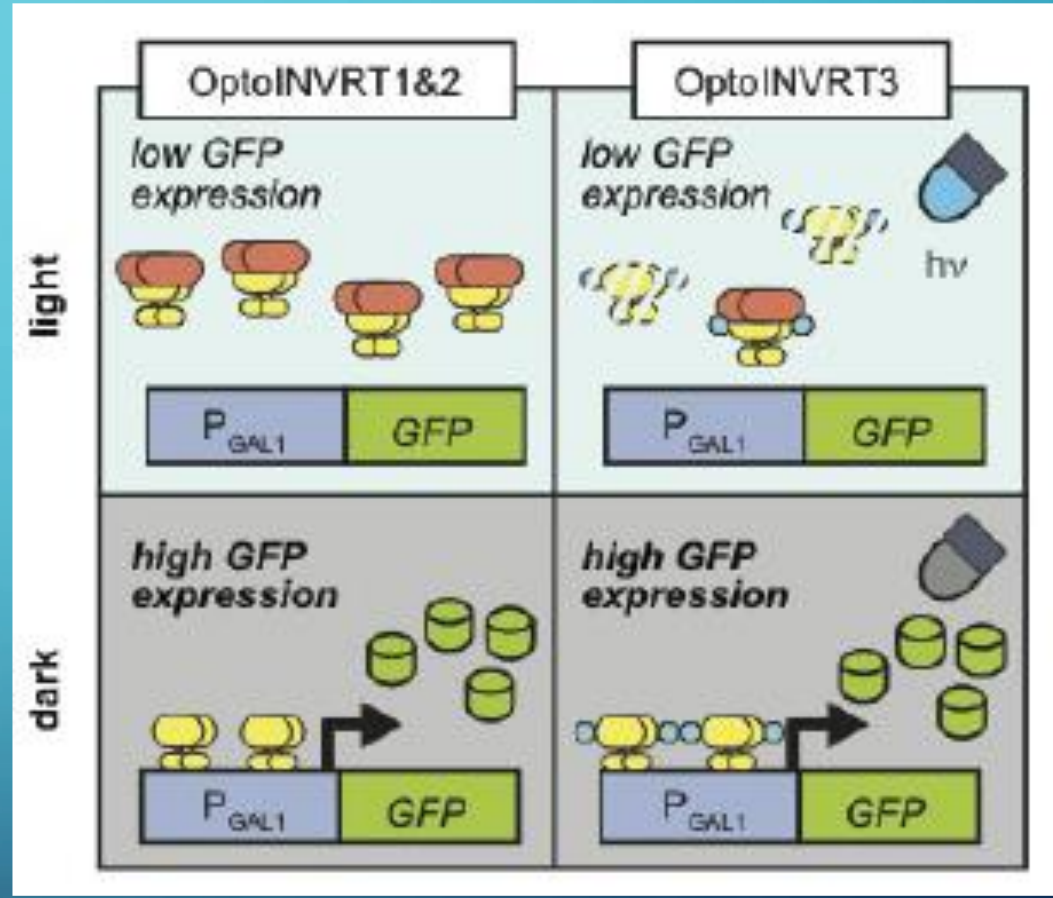
OPTOINVRT

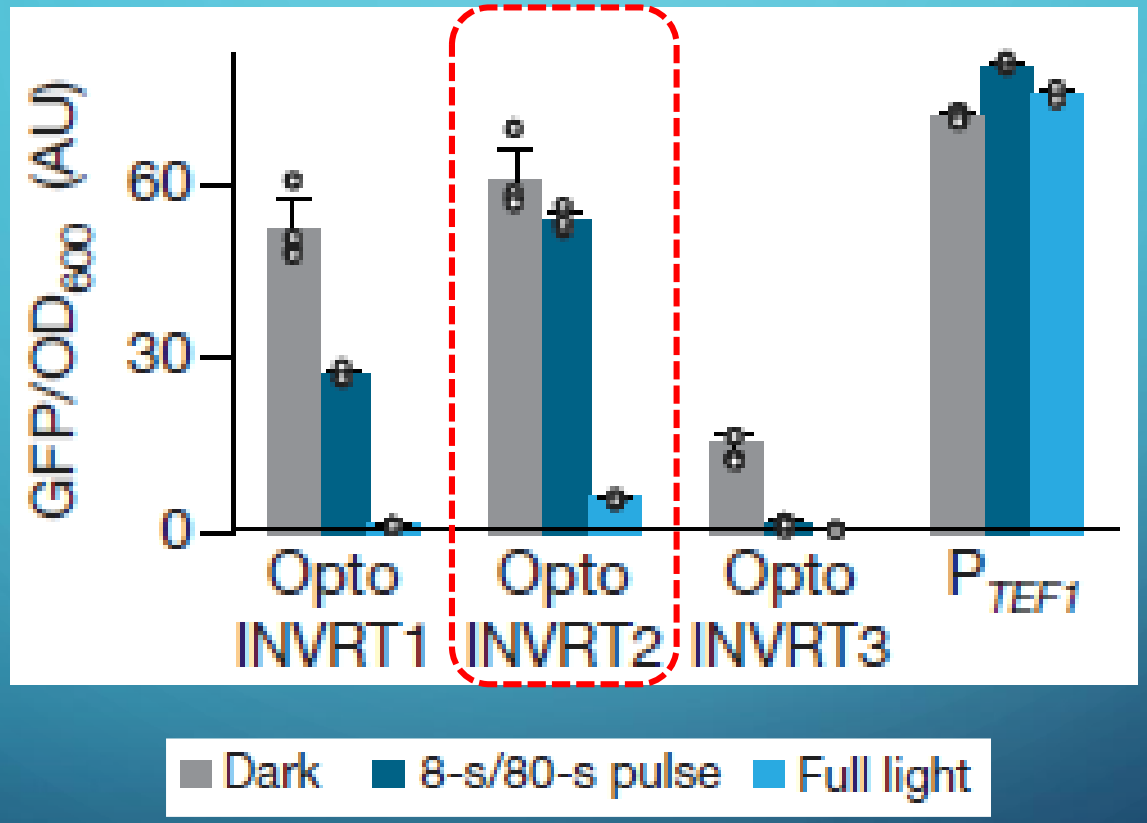
- استفاده از رگولون گالاکتوز/ لاکتوز: GAL80 به عنوان یک پروتئین دارای نقش تنظیم منفی، فاکتور نسخه برداری GAL4 را مهار کرده و قادر است پروموتر GAL1 را غیر فعال کند.

- فرضیه نویسندگان:

اگر GAL4 بیان دائمی داشته باشد و GAL80 تحت کنترل VP16-EL222 باشد، آنگاه پروموتر GAL1 در تاریکی بیان دائمی دارد و در روشنایی مهار می‌شود (برعکس OptoEXP).


Constitutive Gal4 expression
GAL4
OptoINVRT1
GAL4
OptoINVRT2
GAL4
PSD
OptoINVRT3
Light-inducible Gal80 expression
hv
P C120
GAL80
P C120
GAL80


OptoINVRT1&2
OptoINVRT3
light
dark
low GFP expression
low GFP expression
hv
P GAL1
GFP
P GAL1
GFP
high GFP expression
high GFP expression
P GAL1
GFP
P GAL1
GFP

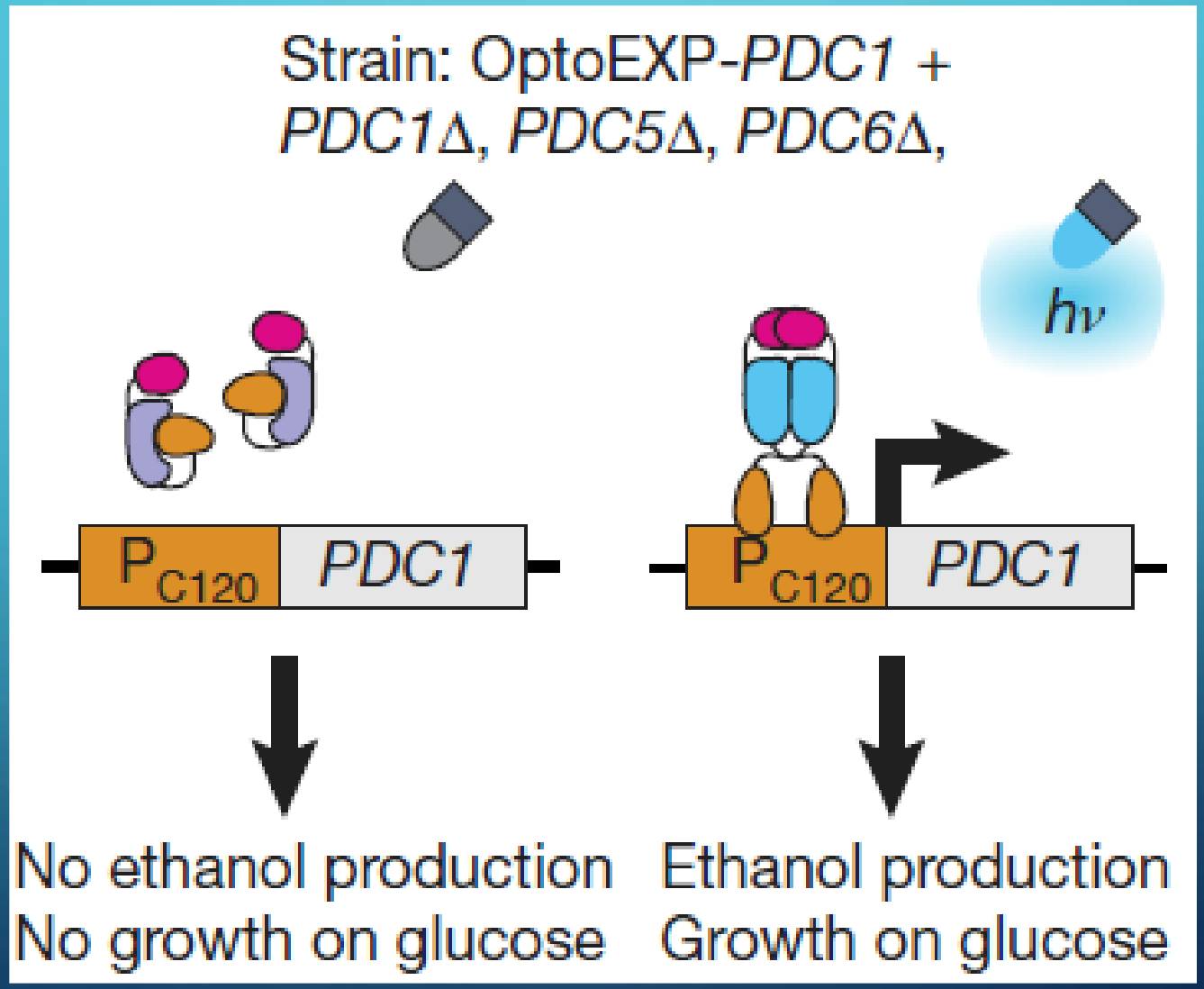

GFP/OD600 (AU)
60
30
0
Opto INVRT1
Opto INVRT2
Opto INVRT3
PTEF1
Dark
8-s/80-s pulse
Full light

این امکان وجود دارد که با تکنیک‌های مهندسی ژنتیک بیان یک ژن مدنظر را تحت کنترل نور قرار داد.

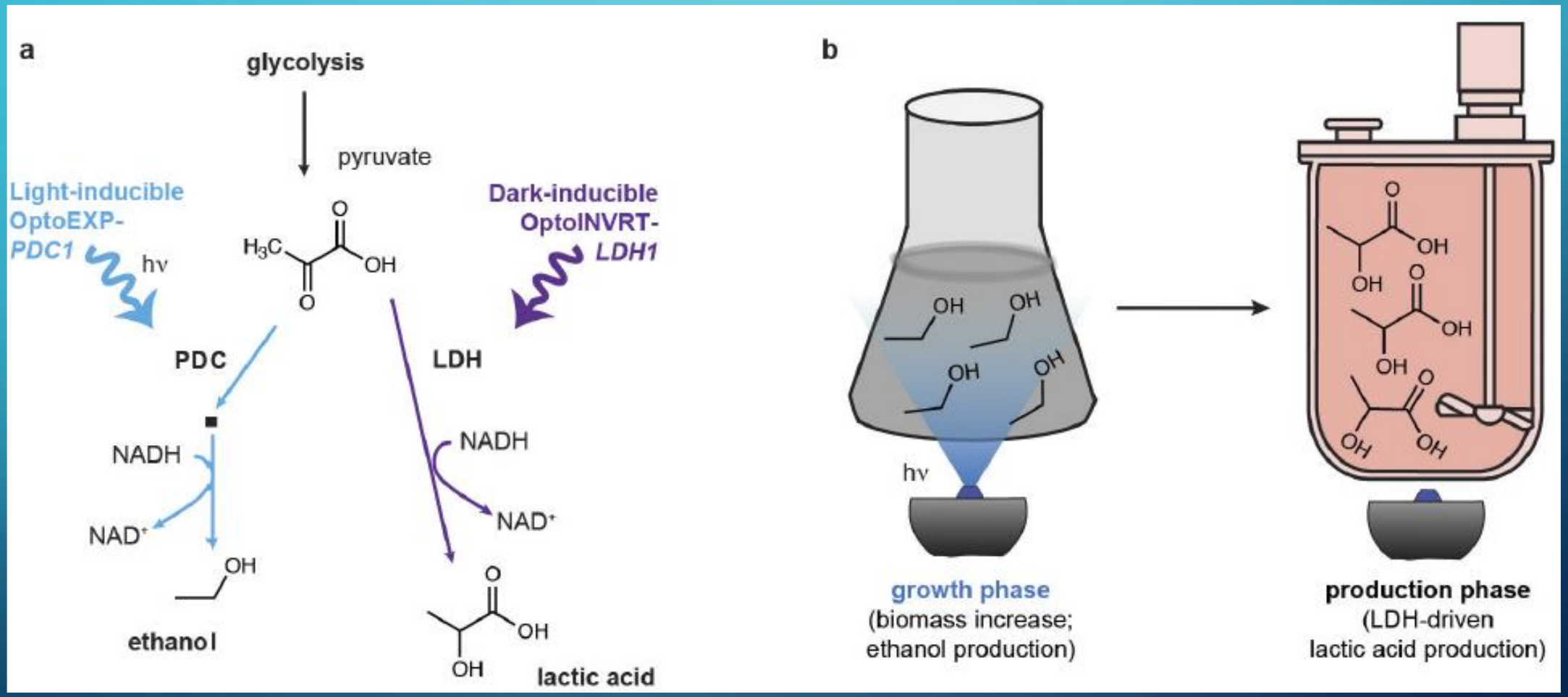
ژن‌های تحت کنترل اپتوژنتیکی این مطالعه برای مهندسی متابولیسم

- ژن پیرووات دکربوکسیلاز ۱ (PDC1) برای کنترل تولید اتانول
- ژن لاکتات دهیدروژناز (LDH) برای کنترل تولید لاکتات
- ژن استولاکتات سنتاز (Ilv2) برای کنترل تولید ایزوبوتانول

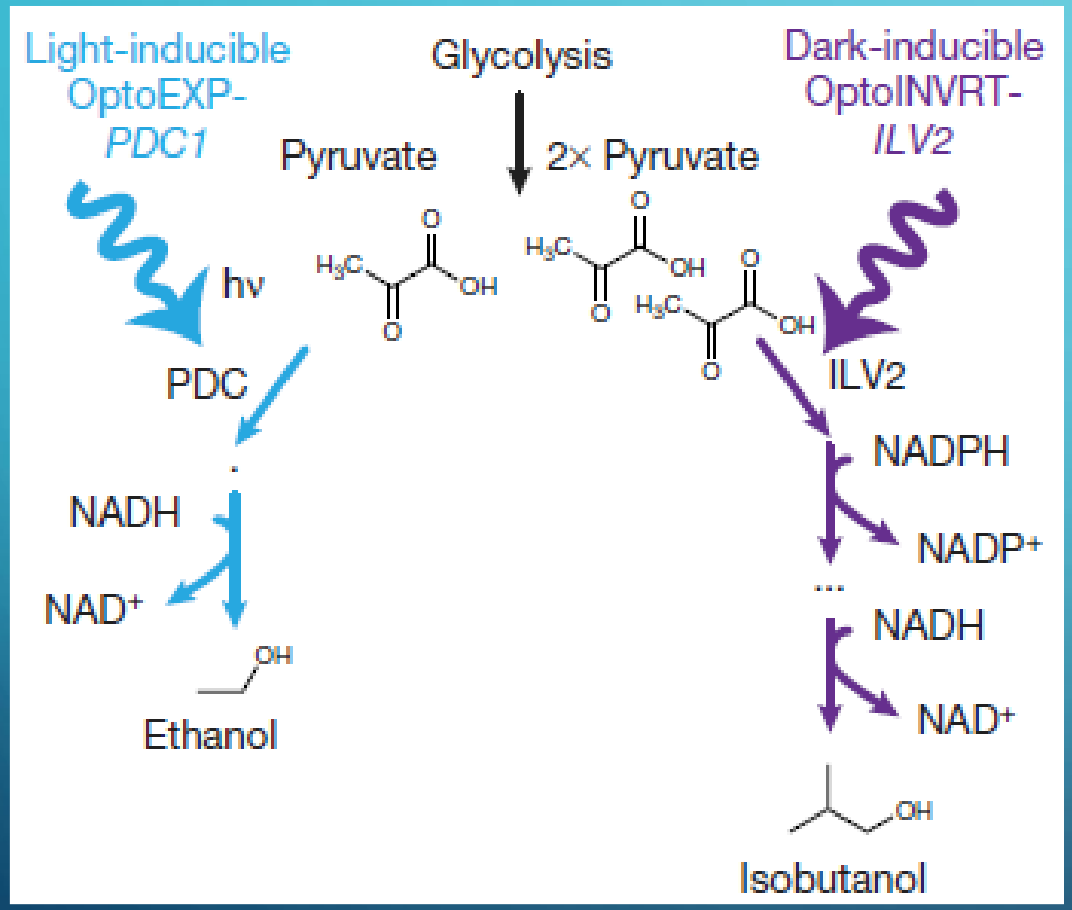
کنترل اپتوژنتیکی تولید اتانول توسط سیستم EL222

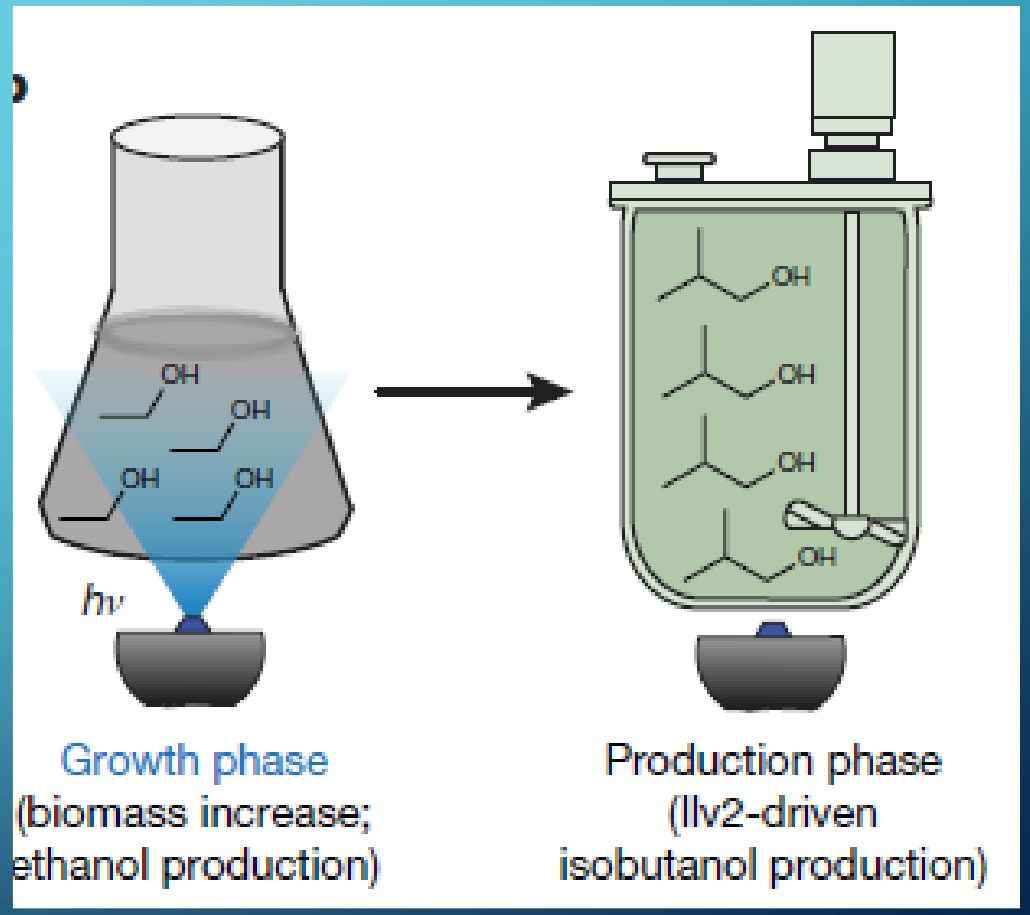


کنترل اپتوژنتیکی مسیر تولید اتانول یا لاکتات تحت کنترل سیستم
OPTOEXP و OPTOINVRT

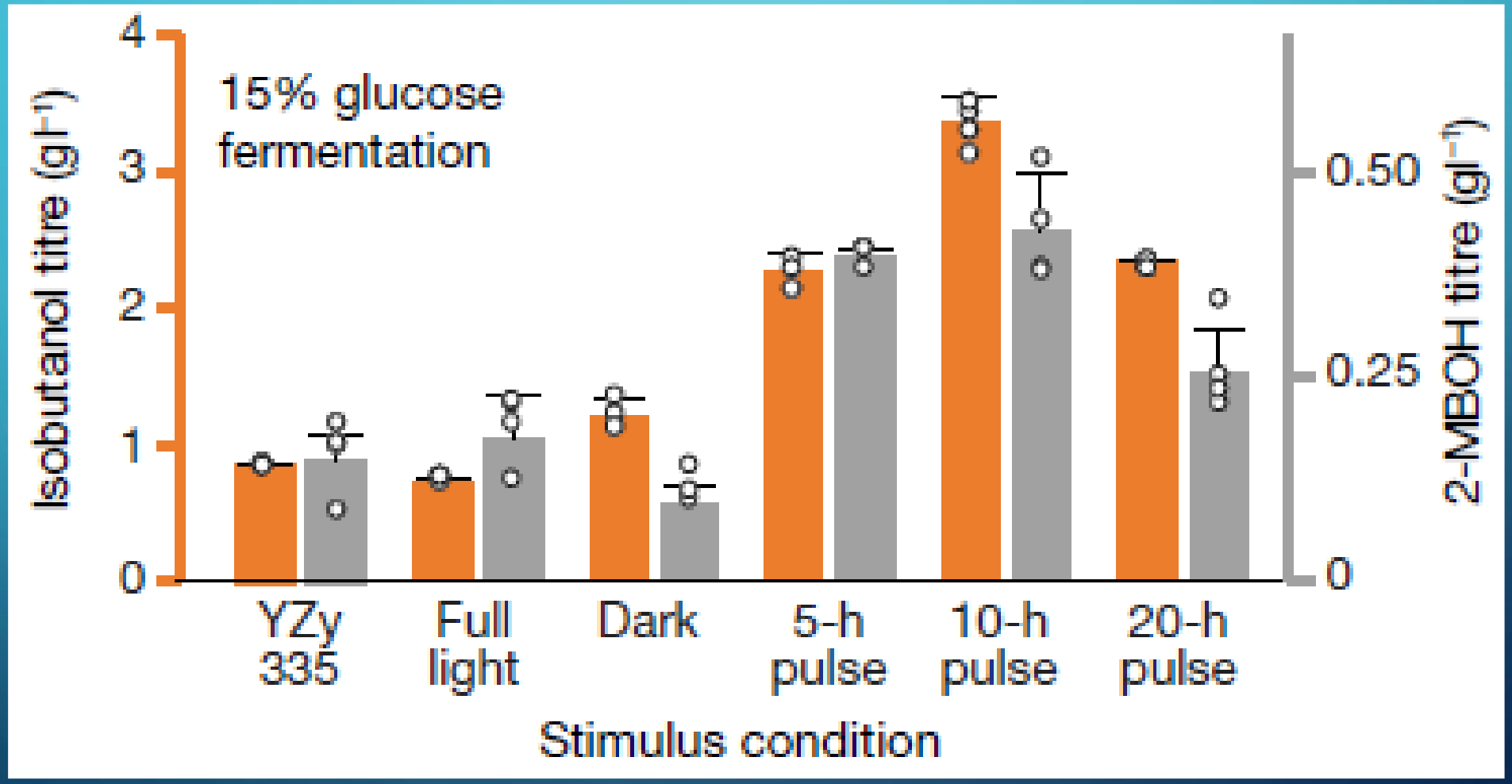


کنترل اپتوژنتیکی مسیر تولید اتانول یا ایزوبوتانول تحت کنترل سیستم
OPTOINVRT و OPTOEXP

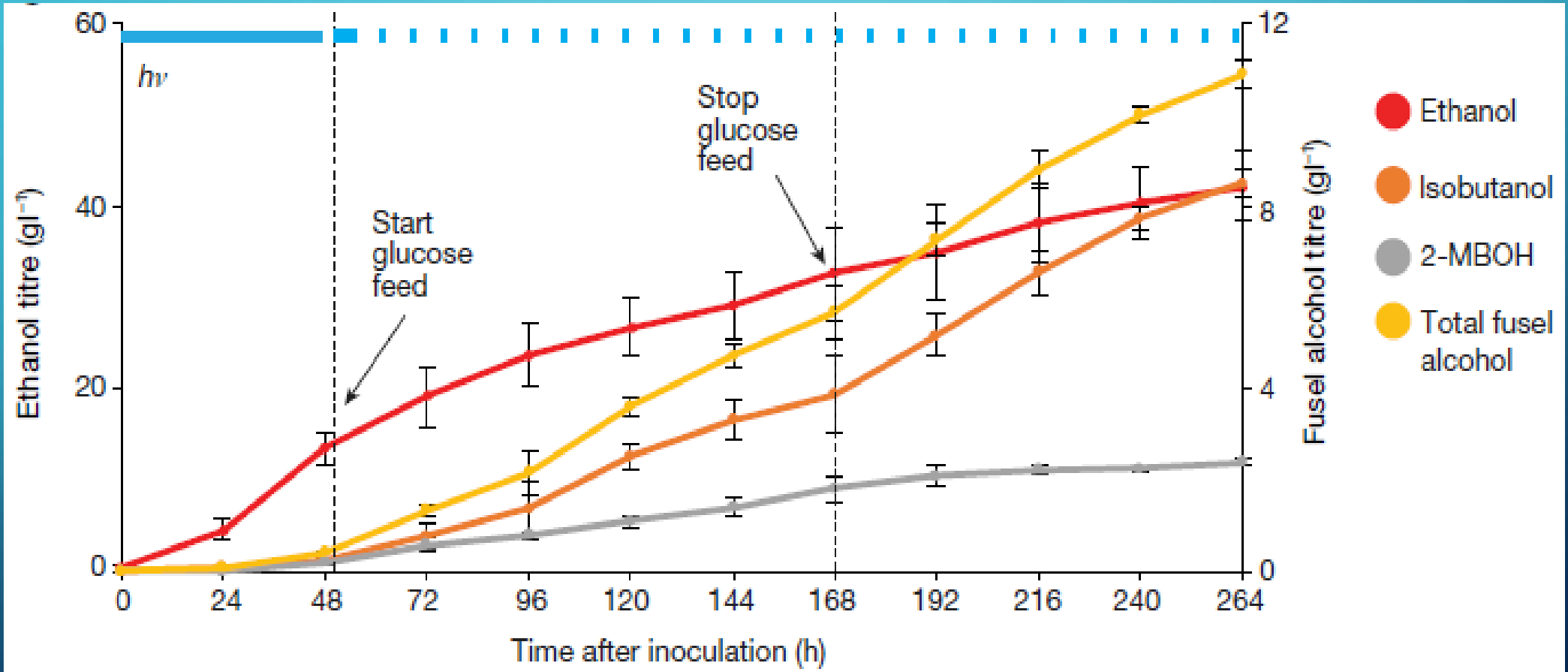


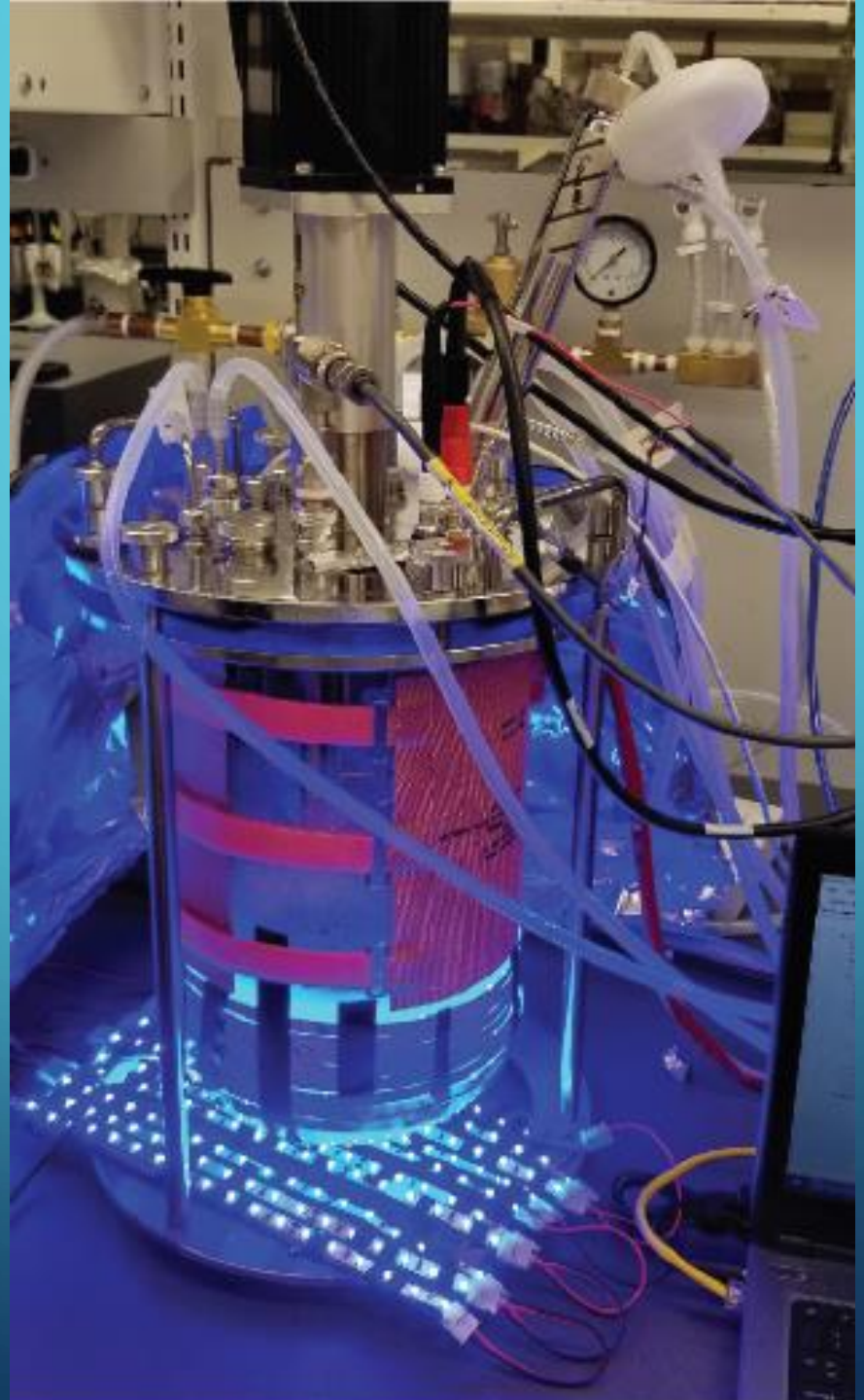


مقایسه تولید الکل‌های سوختی در سویه وحشی و سویه کنترل شده اپتوژنتیکی در شرایط مختلف نور دهی



نتیجه کنترل اپتوژنتیکی مسیر تولید الکل‌های سوختی تحت کنترل سیستم OPTOEXP و OPTOINVRT





جمع بندی

- تنظیم اپتوژنتیکی مسیرهای متابولیکی نوعی استراتژی جدید برای بهینه سازی مسیرهای مهندسی شده در شرایط تخمیر توسط پالس‌های متناوب نوری به شمار می‌رود. اگرچه استفاده صنعتی از این تکنیک نیازمند پیشرفت‌های بیشتری می‌باشد.
- این پیشرفت‌ها می‌تواند شامل نوردهی کنترل شده و اتوماتیک در پاسخ به فیدبک‌های مختلفی از نتایج تخمیر مانند چگالی نوری باشد.

سپاس از توجه شما