

Titel

CRISPR/Cas9 för utveckling av framtidens lignocellulosa-jäst, ref.nr 17-498

Projektgrupp

Dr. Cecilia Geijer, Dr. Fábio Faria Oliveira, vid Avdelningen för Industriell Bioteknik, Chalmers Tekniska Högskola, och mastersstudent Adrian Hochkeppel från University of Halle, Tyskland

Sammanfattning

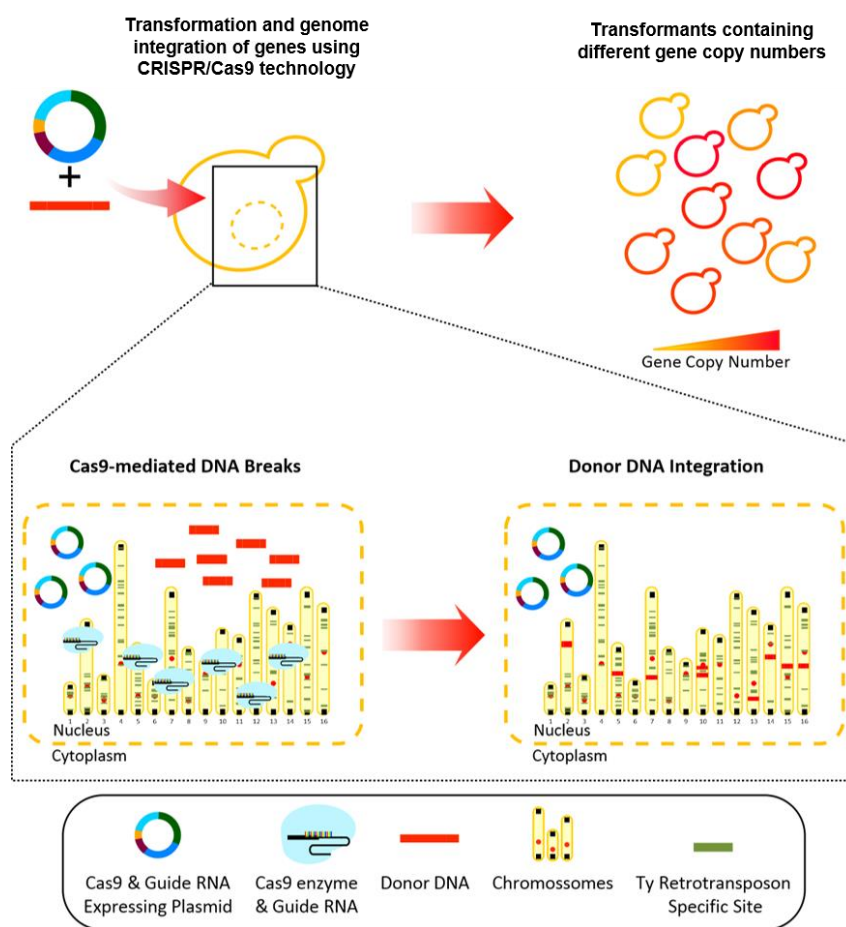
Ett framtida konkurrenskraftigt biobaserat samhälle bygger på att förnybara råvaror kan utnyttjas effektivt för produktion av exempelvis bränslen, kemikalier och material. För att nå ekonomisk bärighet för en sådan produktion baserad på växtbiomassa, lignocellulosa, krävs optimering av flera steg i processen, inte minst det steg där mikroorganismer omvandlar sockret till produkt. Det här projektets övergripande mål har varit att ta skraddarsy jäststammar för lignocellulosa-baserad produktion. För detta ändamål har vi arbetat för att utveckla en ny metod för markörfri genom-modifiering av industriella jäststammar. Metoden, som är baserad på CRISPR/Cas9-teknik, möjliggör att vi kan sätta in flera genkopior i ett enda steg i jästgenomet vilket resulterar i högt uttryck av de proteiner som generna kodar för. Det här är användbart för att konstruera jäststammar som kan tillgodogöra sig alla de socker som återfinns i lignocellulosa och därmed bli mer effektiva cellfabriker. I projektet har vi konstruerat alla de plasmider som behövs för metoden, och visat att den fungerar för att genom-modifiera industriella jäststammar. Vidare har vi producerat det genetiska material som behövs för att utveckla jästen till att metabolisera disackariden cellobios; ett viktigt socker i lignocellulosa-hydrolysat. I framtiden kan cellobios-jäsande jäststammar bidra till en ekonomiskt lönsam produktion av biobränslen och biokemikalier.

Introduktion

För att tillverka mervärdesprodukter från lignocellulosa (som består av cellulosa, hemicellulosa och lignin) behöver biomassan först förbehandlas så att socker från hemicellulosan frigörs och cellulosans kristallina struktur bryts ner. I nästa steg, den enzymatiska hydrolysen, bryts cellulosans sammanlänkade glukosmolekyler ner till glukos med hjälp av en cocktail av cellulolytiska enzymer, och allt det fermenterbara sockret jäsas slutligen av en mikroorganism. Biomassans struktur och komplexa sammansättning begränsar tillgängligheten och användningen av kolhydraterna, och för lignocellulosa-baserad etanolproduktion beräknas kostnaden för enzym-cocktailen uppgå till 1-2\$/gallon producerad etanol, vilket motsvarar omkring 20% av totalkostnaden för processen (Humbird 2011, Technical Report NREL). Även jäsningssteget är i dagsläget ineffektivt, både på grund av att jäsningsen av xylos (som näst efter glukos är det vanligast förekommande sockret i lignocellulosa) och mer komplexa sockerarter (cellobios, xylan) är suboptimal, liksom av förekomsten av mikrobiella inhibitorer som påverkar produktutbytet negativt. Utvecklandet av en tålig mikroorganism som effektivt både kan producera enzymer för att bryta ner lignocellulosans komplexa sockerarter och samtidigt jäsa dessa till exempel etanol skulle göra produktionen betydligt mer kostnadseffektiv. Konceptet, där enzym-produktion, försockring av polysackarider och jäsnings kombinerats i en enda process kallas consolidated bioprocessing (CBP).

I det här projektet har vi påbörjat vidareutvecklandet av en robust, inhibitortålig, xylosjäsande industriell stam av jästen *Saccharomyces cerevisiae* som har goda förutsättningar för att bli framtidens CBP-mikrob. Som ett första steg har vi här försett jästen med gener för fermentering av disackariden cellobios, vilken är en av huvudprodukterna vid cellulosa-hydrolys. En jäst som kan jäsa xylos och cellobios parallellt (sk co-fermentering) uppvisar effektivare xylosjäsning vilket leder till högre utbyte och produktivitet, jämfört med jäst som jäser xylos först när glukosen använts upp (Joong Oh 2016, AEM).

En av svårigheterna för förverkligandet av framgångsrika CBP-mikrober är att det krävs höga koncentrationer av de cellulolytiska enzymerna för att nå tillräcklig verkningsgrad (Lynd 2005, Current Opinion in Biotechnology). I det här projektet har vi därför haft som mål utveckla en ny metod för att optimera uttrycket av gener. Metoden är baserad på CRISPR/Cas9-systemet (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated proteins), en teknik som på senare år har revolutionerat gen-modifiering i en rad olika organismer tack vare systemets effektivitet, specificitet och att det fungerar utan att lämna ärr eller markörer såsom antibiotikaresistens-gener efter sig. Tekniken består av Cas9-proteinet, ett endonukleas-enzym som kan klippa DNA, och en syntetisk guide RNA-molekyl som är utformad för att styra Cas9 enzymet till rätt ställe i genomet där Cas9 klipper DNAt och orsakar ett kromosom-brott. Cellen förses också med en DNA-sekvens (donor-DNA) som innehåller genen som ska sättas in i genomet på detta specifika ställe och därmed laga kromosom-brottet. Genom att CRISPR/Cas9 riktas mot specifika "LTR1"-sekvenser i retrotransposoner som finns på ett 100-tal platser i genomet, kan flera genkopior sättas in samtidigt (sk delta-integration (Fig. 1).



Figur 1. Översikt CRISPR/Cas9-metoden som utvecklats i projektet.

Projektmål och måluppfyllelse

Det övergripande målet med projektet har varit att utveckla jäststammar som är optimerade för lignocellulosa-baserad produktion av biobränslen och biokemikalier, där vi har jobbat mot två specifika delmål:

Delmål 1: Att utveckla en ny CRISPR/Cas9-metod för gen-modifiering av industriella stammar av jästen *S. cerevisiae*. Delmålet har uppfyllts med god marginal. Vi har optimerat transformationsprotokollet för industriella stammar, designat och byggt plasmider för att möjliggöra CRISPR/Cas9-medierad delta-integration, och lyckats visa att metoden fungerar.

Delmål 2: Att förse industriella stammar av *S. cerevisiae* med gener för att kunna förjäsa cellobios. Vi har arbetat framgångsrikt även mot detta delmål, och producerat plasmider för cellobios-gener som vi har lyckats uttrycka i industriella jäststammar.

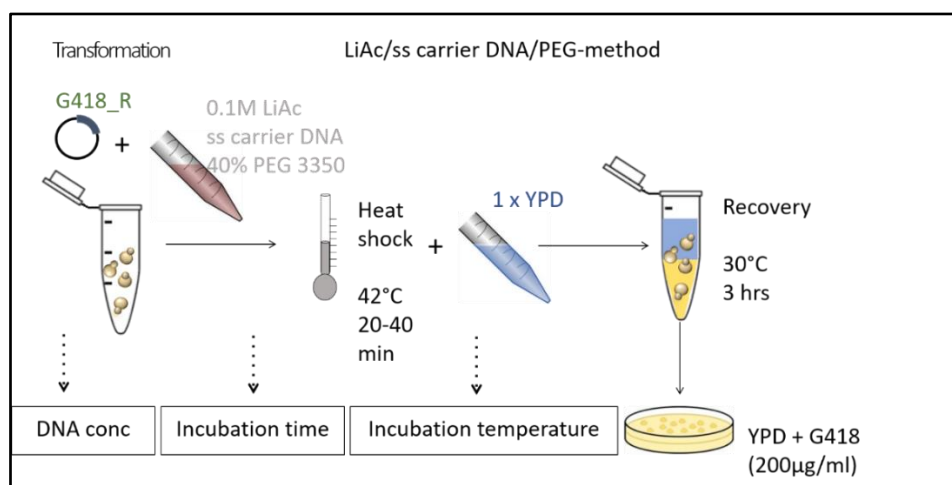
Resultaten beskrivs och diskuteras mer ingående nedan.

Resultat

Optimering av transformationsprotokollet för industriella jäststammar

För att kunna modifiera industriella stammar av *S. cerevisiae* genetiskt krävs det att vi kan transformera dem med externt tillsatt DNA som tas upp och integreras i genomet. Industriella stammar är mycket svårare än att transformera än laborierstammar (Kawai 2010, Bioengineered Bugs). Då vår metod kräver hög transformations-effektivitet, valde vi att först optimera transformations-protokollet för två olika xylos-jäsande industriella stammar, XXX och Taurus04, som båda utvecklats sedan tidigare i vårt laboratorium (Westman 2014, Biotech for Biofuels). Som positiv kontroll och jämförelse inkluderade vi också en laborierstam, CEN.PK, som är lätt att transformera.

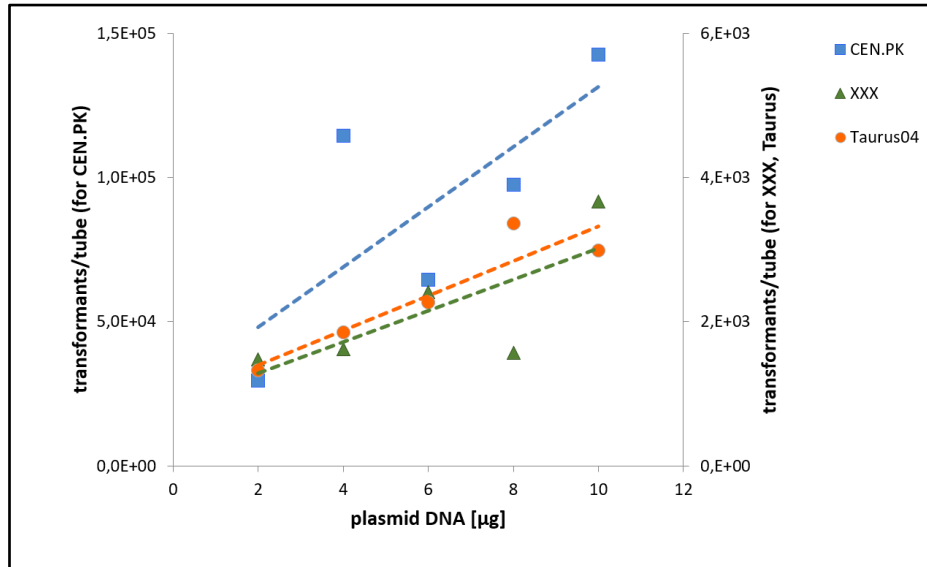
Det valda transformationsprotokollet bygger på att cellerna inkuberas med plasmid-DNA i en lösning innehållande litiumacetat (LiAc) vid 42°C för att facilitera upptag av DNA. Plasmid-DNA kodar här för en antibiotikaresistensgen, och de celler som tagit upp och integrerat DNA:t kan sedan selekteras för på tillväxtmedium som innehåller motsvarande antibiotika (här geneticin; G418) (Fig. 2).



Figur 2. Översikt transformationsprotokollet för jäst.

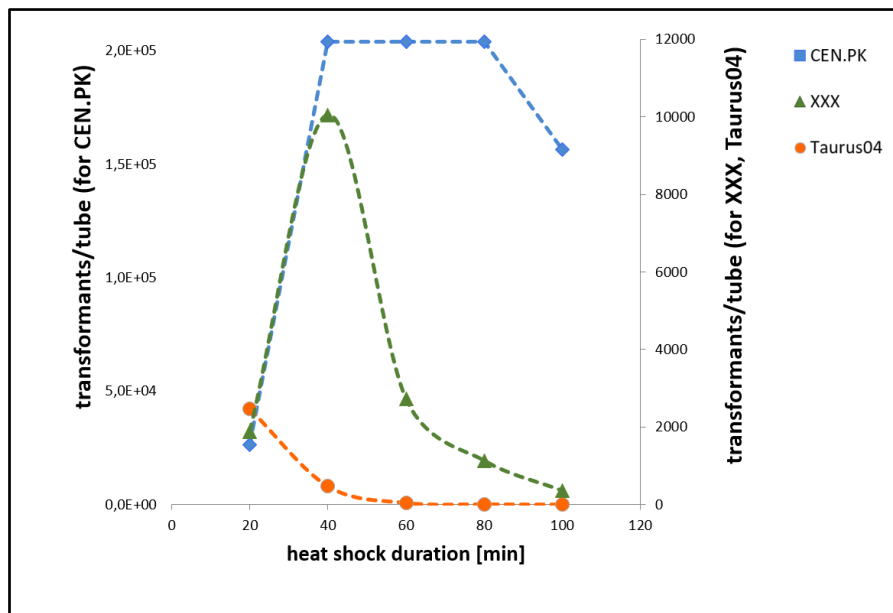
Vi transformerade alla tre stammarna med varierande koncentration av plasmid-DNA och inkubationstid vid 42°C, för att bestämma de optimala betingelserna för respektive stam.

Som väntat ökade antalet transformanter med ökad mängd tillsatt plasmid-DNA för alla stammarna, och laboriestammen CEN.PK hade en mycket högre transformation-effektivitet än de industriella stammarna, mätt i antal transformanter per transformation. För CEN.PK fick vi >100 000 transformanter från 10 μ g plasmid-DNA, medan motsvarande mängd DNA resulterade i ca 3000 transformanter var för XXX och Taurus04. (Fig. 3).



Figur 3. Transformationseffektivitet för laborie- och industriella stammar med varierande mängd plasmid-DNA.

Vidare undersökte vi hur transformationseffektiviteten påverkades av inkubationstiden genom att variera den från 20 till 100 minuter (40 min enligt standardprotokollet). Till vår förvåning såg vi att effektiviteten för de industriella stammarna minskade drastiskt redan efter 20 min för Taurus04 och 40 min för XXX. Laboriestammen CEN.PK däremot är inte känslig för värmen, och antalet transformanter minskar först mellan 80 och 100 min (Fig. 4).

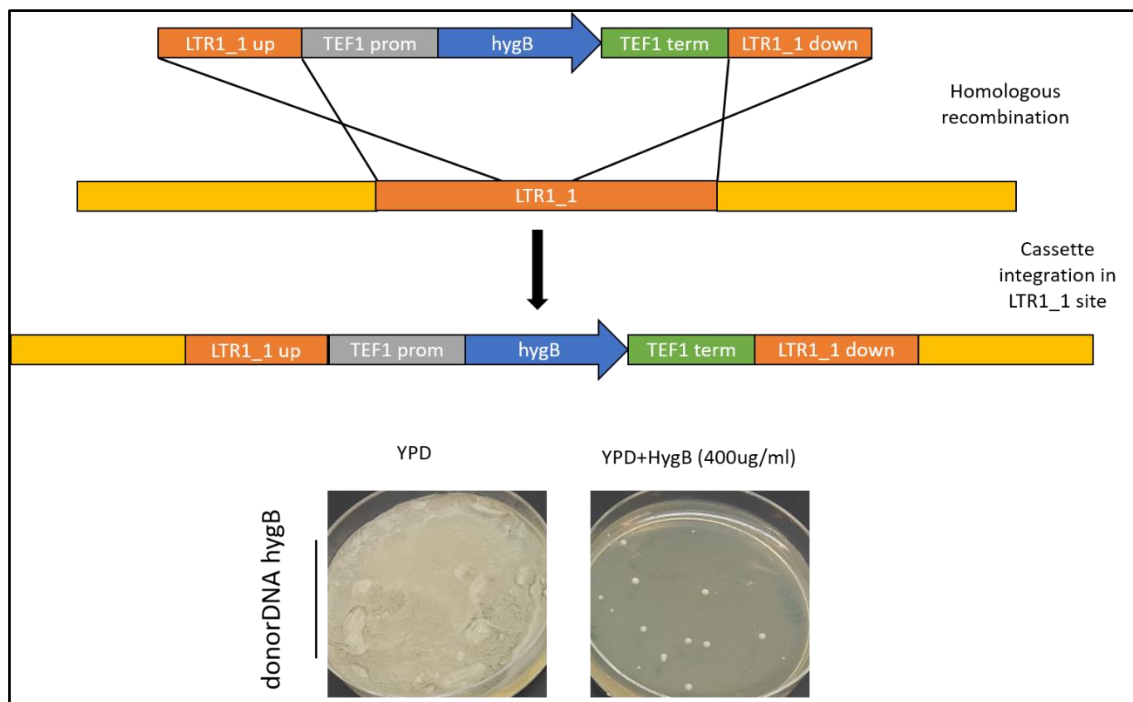


Figur 4. Transformationseffektivitet vid olika längd på inkubationstiden.

Vi tolkar de här resultaten som att de industriella jästcellerna dör vid förlängd inkubation vid 42°C, vilket åtminstone delvis kan förklara deras låga transformations-effektivitet. Vi kan slå fast att det optimala transformationsprotokollet skiljer sig åt för de olika stammarna, och vi förutspår att transformationseffektiviteten för de industriella stammarna kan förbättras avsevärt genom att optimera protokollet ytterligare.

Genom-integrering av DNA i transposoner

I nästa steg designade vi linjärt DNA som kan transformeras med det optimerade protokollet och därefter sätts in i genomet i konserverade LTR1-sekvenser i Ty retrotransposoner som finns utspridda i jästens genom (delta-integration). För att utveckla metoden använde vi oss av en gen, HygB, som kodar för ett protein som ger resistens mot antibiotikan hygromycin, och som flankerades av DNA som är homologt till LTR1-sekvensen i transposonerna. Vi transformerade jästen med DNAt och selekterade för de celler som med hjälp av homolog rekombination integrerat HygB-genen i genomet och därmed kan växa på agar-plattor med antibiotikan. Experimentet visade att LTR1-integrering fungerar utmärkt i både laboriestammen och i de industriella stammarna (Fig. 5).

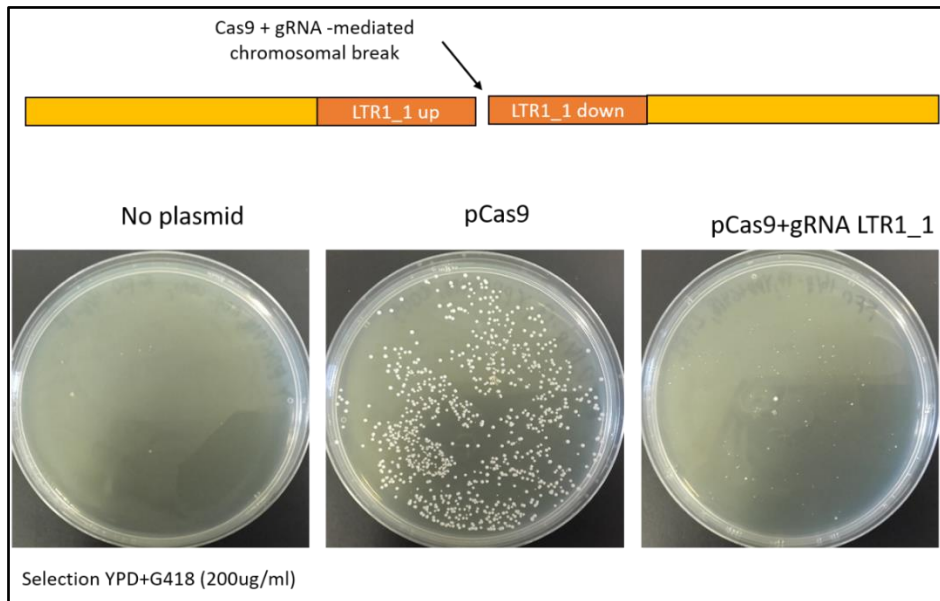


Figur 5. Delta-integrering av hygB-genen ger upphov till hygromycin-resistenta transformanter.

Design och konstruktion av CRISPR/Cas9-plasmider för att facilitera delta-integrering

CRISPR/Cas9 har i tidigare studier visats facilitera simultan insättning av flera genkopior i genomet (Shi 2016, Metabolic Engineering), vilket vi är ute efter med vår metod. Vi designade två plasmider: en som innehåller genen som kodar för Cas9-nukleaset, och en som innehåller både Cas9-genen och en gen som kodar för ett sk guideRNA (gRNA) som guidar Cas9 till LTR1_1 för att åsamka kromosombrott. Celler som tagit upp plasmid kan selekteras för på agar-plattor som innehåller geneticin (G418), då båda plasmiderna också innehåller en resistensgen för antibiotikan. Vi ser att celler som tagit upp Cas9-plasmiden växer bra på G418-plattor, medans celler med Cas9+gRNA är väldigt sjuka pga alla

kromosombrott som orsakas av att Cas9 klipper i LTR1-sekvenserna i genomet (Fig. 6). Det här betyder att våra plasmider fungerar i både laboriestedammen och de industriella stammarna.

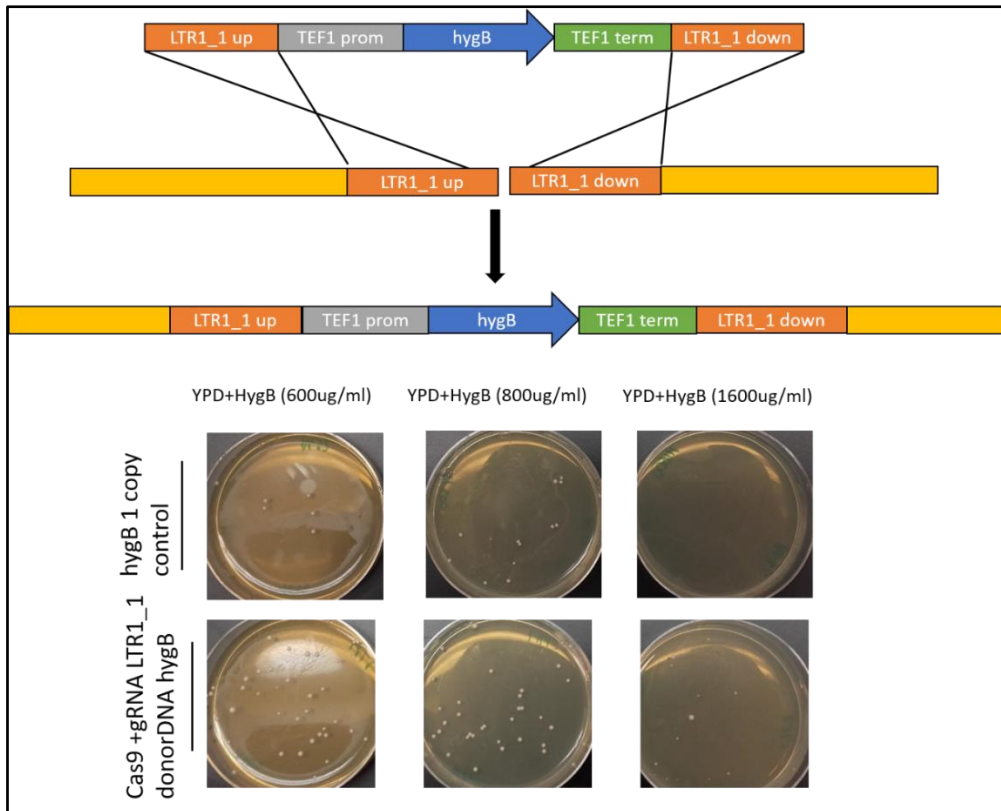


Figur 6. Transformanter som tagit upp plasmid kan växa på plattor med geneticin, men Cas9+gRNA gör cellerna sjuka pga kromosombrott.

Cas9+gRNA + donorDNA med hygromycin

Därefter transformerade vi in Cas9+gRNA-plasmiden tillsammans med linjärt donor-DNA med HygB-genen som vi visat kan integrera vid LTR1 i transposonerna och därmed laga kromosombrotten orsakade av Cas9. Ju fler HygB-gen-kopior som sätts in i genomet, desto högre koncentration antibiotika klarar cellerna av att växa på (Lian 2016, Biotechnol Bioeng). Som kontroll för hur mycket antibiotikaresistens en genkopia ger upphov till, transformerade vi också in HygB på en centromerisk plasmid (1 plasmid/cell).

Vi ser att metoden fungerar, celler transformerade med HygB-genen på den centromeriska plasmiden kan växa på hygromycin-koncentrationer upp till 800ug/ml, medan celler som transformerats med Cas9+gRNA + linjärt HygB donorDNA kan växa på så mycket som 1600ug/ml, vilket indikerar att fler än en HygB-genkopior har integrerats i genomet (Fig. 7). Dessvärre får vi relativt få transformanter, antagligen pga den låga transformations-effektiviteten hos de industriella stammarna. Även om metoden behöver utvecklas vidare för att öka transformationseffektiviteten ytterligare och för att kunna bestämma antalet kopior som satts in i genomet, är det här ett väldigt positivt resultat.

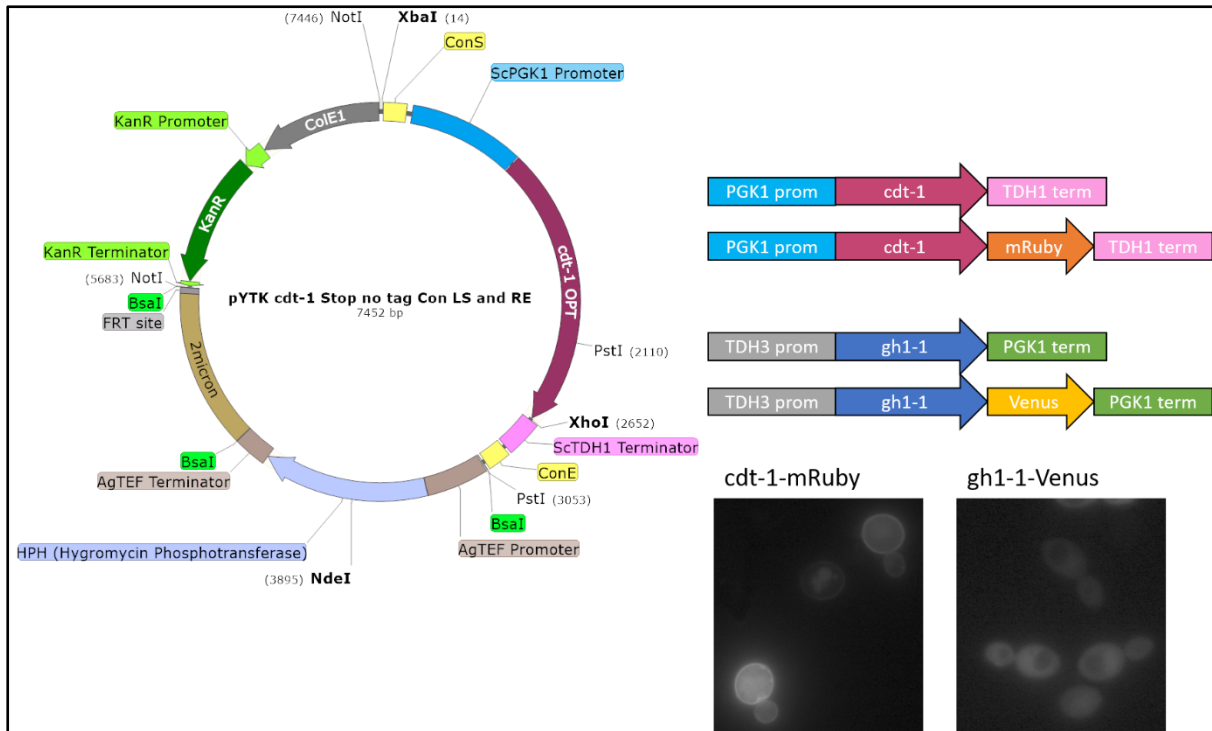


Figur 7. CRISPR/Cas9-medierad delta-integration ger transformanter överleva högre koncentrationer antibiotika än transformanter med centromerisk plasmid.

Konstruktion av plasmider innehållande generna *cdt-1* och *gh1-1* som möjliggör cellobios-växt

I nästa steg kan CRISPR/Cas9-metoden användas för att utveckla jäststammar som kan förjäs disackariden cellobios vilket är användbart vid lignocellulosabaserad produktion av biobränslen och biokemikalier. Här nyttjade vi gener från den cellulolytiska svampen *Neurospora crassa* som möjliggör upptag och hydrolys av cellobios; *cdt-1* som kodar för en cellodextrintransportör för upptag av cellobios och *gh1-1* som kodar för ett intracellulärt β -glukosidas som hydrolyserar cellobios till glukos som *S. cerevisiae* kan tillgodogöra sig. Dessa gener har tidigare uttryckts i *S. cerevisiae* med gott resultat, men då främst i laboriestammar och från plasmid (Zha et. Al, 2013, PLoS One).

Vi har syntetiserat generna (GenScript) och klonat in dem i plasmider. Vi har också konstruerat plasmider för att kunna märka de kodade proteinerna med fluorescerande tags som möjliggör cellulär lokalisering via fluorescens-mikroskopering. Vi ser att transportören *cdt1-mRuby* lokaliserar till plasma-membranet, och enzymet *gh1-1-Venus* till cytoplasman, vilket betyder att båda proteinerna är uttryckta och rätt lokaliserade (Fig. 8).



Figur 8. Kloning och uttryck av gener som kodar för en transportör och ett enzym för hydrolys av cellobios.

Nästa steg är att sätta in generna mha delta-integration i jästens genom och sedan isolera transformanter som ett optimalt kopia-antal av generna och därmed effektivt kan ta upp och hydrolysera cellobios.

Summering och slutsatser från projektets resultat

I det här projektet har vi utvecklat en metod för att genom-modifiera industriella stammar av *S. cerevisiae*. Vi har här optimerat transformations-protokollet då metoden kräver hög transformations-effektivitet, och visat att vår metod med CRISPR/Cas9-medierad delta-integrering fungerar. Det är tydligt att det är en långt större utmaning att transformera industriella stammar än laboratoriestammar, men att optimering av protokollet är möjligt. Metoden förväntas kunna användas i framtiden för att vidareutveckla jäststammar till effektiva sockerplattformar för produktion av avancerade biobränslen och biokemikalier.

Vi har också producerat de plasmider som krävs för att kunna integrera gener för cellobios-jäsning, och visat att proteinerna som generna kodar för uttrycks och lokaliserar rätt inne i jästcellen. Utvecklandet av cellobios-jäsande jäststammar är ett steg i processen att skapa ekonomiskt lönsam produktion av från lignocellulosa, vilket är viktigt för att kunna minska vårt beroende av fossil olja och gas.