

Kunsten at manipulere skimmelsvampe selvom de ikke vil

Skimmelsvampe har mange roller i samfundet, både positive og negative. De udfylder eksempelvis en stor rolle i bioteknologisk produktion. Deres begrænsning ligger til en vis grad i, at det er relativt tidskrævende at lave specifikke genetiske manipulationer. Her præsenteres en teknologi, der muliggør stammeforbedringer effektivt og hurtigt

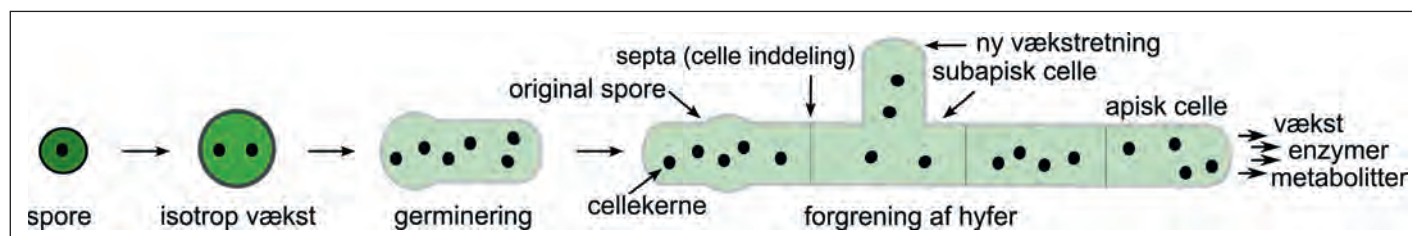
Af Jakob Blæsbjerg Nielsen (postdoc), Center for Mikrobiel Bioteknologi (CMB), Institut for Systembiologi, DTU

Ingen kan anfægte skimmelsvampes enorme betydning for opretholdelsen af den økologiske balance på Jorden ved recirkulering af organisk materiale. De er sammen med andre mikroorganismer effektive nedbrydere af simple og komplekse forbindelser. Skimmelsvampe har en utrolig evne til at udskille et batteri af enzymer gennem spidsen af et hurtigt og kraftfuldt voksende netværk af rod lignende tråde (hyfer, figur 1 og 2). Samme vej udsendes en række bioaktive stoffer, heriblandt de sekundære metabolitter (SM), hvoraf adskillige allerede har fundet anvendelse i medicinsk øjemed, f.eks. penicillin og lovastatin. Netop produktionen af enzymer og SM, foruden de organiske syrer og oste, har givet skimmelsvampe en hovedrolle i industrien. Dette er kun starten, da andre produkttyper vil vinde frem. For ud over at være effektive til at udskille produkter har skimmelsvampe en stor fordel i, at de er lette at håndtere og opbevare – og de kan dyrkes i/på billige vækstmedier. Dog er det en stor hindring i f.eks. SM og heterolog proteinpro-

et attraktivt og vigtigt område at arbejde inden for. Adskillige *Aspergillus*-arter kan producere ekstremt potente giftstoffer (mykotoksiner), men også forårsage infektion af organer, hyppigst lungerne, i immunsvækkede mennesker og dyr, ofte med døden til følge. Derved kan arbejdet i *A. nidulans* vise sig at være yderst værdifuldt, da viden erhvervet fra genetikken og genomanalyser overføres og relateres mellem slægtens arter. De molekylære værktøjer, der udvikles, er oftest mulige at overføre mellem arterne. Systemet er tænkt til at fungere bredt og for at kunne præsentere det, er en kort indføring i genmanipulation og mekanismer nødvendig.

Gensplejsning i *Aspergillus*

Grundstenen og teknologierne til at tilføje gener fremstillet *in vitro* ved genetisk transformation i skimmelsvampe fik vind i sejlene i 1980'erne, og de metoder ligger stadig til grund for de mest populære transformationsprocedurer i dag [3]. De ønskede



Figur 1. Et simplificeret billede på starten af et vækstforløb for skimmelsvampen *Aspergillus nidulans*.

duktion, at mange skimmelsvampe er relativt svære at ændre genetisk, sammenlignet med eksempelvis visse gærarter. Dette problem skal løses, før industrien kan udnytte skimmelsvampene til fulde.

På Center for Mikrobiel Bioteknologi ved DTU er der udviklet et genetisk transformationssystem. Det er designet til generelt at fungere hen over arter, og det vil gøre det lettere at foretage genetiske optimeringer og ændringer i skimmelsvampe [1]. Genetiske ændringer der engang tog mange måneder at udføre, hvis det overhovedet lykkedes, kan nu udføres inden for en måned, når systemet er sat op i den pågældende svamp.

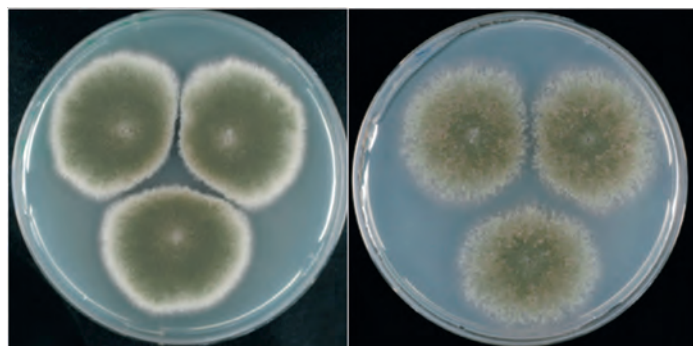
For at konstruere og teste transformationssystemet er *Aspergillus nidulans*, en modelskimmelsvamp for svampebiologi, blevet valgt. *A. nidulans* er velkendt og fuldt genomsekventeret, hvilket betyder, at dens arvemateriale er kortlagt [2]. I modsætning til mange andre skimmelsvampe har den en seksuel livsform. Det giver flere strenge at spille på i stammekonstruktion. Derudover er arten beslægtet med vigtige industrielle og sygdomsfremkaldende aspergilli, to områder der gør *Aspergillus* til

gener indføres enten i celler via cirkulært DNA (plasmid), der kan opretholdes uden at sidde inde i genomet hos værten eller som lineært DNA, der integreres i genomet. Det er svært at holde plasmiderne på et stabilt niveau i *Aspergillus*, og de svinger i antal gennem en voksen koloni (figur 2). Derfor fungerer det ikke at bruge plasmider i produktionsstammer, men kun til forskningsformål. Lineært DNA kan derimod føre til stabil ekspresion af gener, der indsættes i svampen. Det skyldes, at positionen på et kromosom sandsynligvis er stabil og kan nedarves.

Når et stykke DNA skal integreres i en cellekernes DNA, er vi afhængige af, at de eksisterende cellulære mekanismer inden for DNA-reparation af skader er funktionelle. Her tænkes der især på de reaktionsveje, der reparerer dobbeltstrengsbrud (DSB) i DNA [4,5]. Netop et DSB er livstruende for cellen, hvis de ikke bearbejdes, men samtidig er det også en nødvendighed for at inkorporere den ønskede information i genomet. Der er to overordnede måder at reparere DSB på, homolog rekombination (HR) og illegitim rekombination (IR, jf. non-homologous

end-joining). HR bruger ensartede sekvenser til at reparere fra og betegnes derfor som fejlfri. IR er derimod oftere behæftet med fejl, men bestemt ikke altid. I denne proces bliver et DSB kureret med en samling af brudte eller tilgængelige ender. Ved fejlbehandling i IR kan DNA-stykker blive sat sammen tilfældigt, eller enderne trimmes, før de sættes sammen, hvilket resulterer i tab af information (figur 3).

Ved indførelse af et lineært DNA-stykke i en celle med homologi til et sted i organismens genom, vil HR og IR give integration af det tilførte DNA det tilsvarende sted på et kromosom. Alternativt indsættes det et tilfældigt sted i genomet. Følges den sidste løsning kan det indførte DNA-stykke sætte sig sammen med sig selv flere gange, før det integreres. Det giver mange kopier af et tilført gen. Det kan på kort sigt medføre en forøget produktion fra det indførte DNA (som RNA, protein- eller stof-



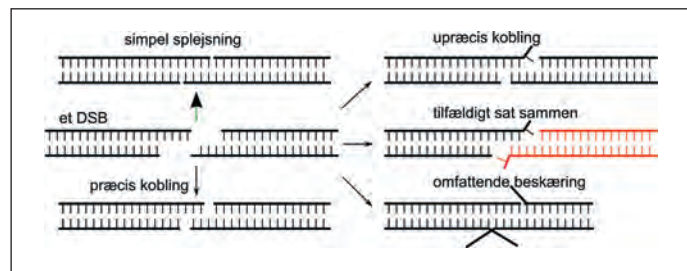
Figur 2. *A. nidulans*-kolonier. Til højre ses normalvækst for en vildtype og til venstre er væksten for en transformant opretholdt med plasmid DNA.

skifteprodukt), men på længere sigt kan de gentagne sekvenser være genetisk ustabile og rekombinere sig selv ud af genomet. Forståelsen af de underliggende processer i DNA-reparation er derfor essentiel i forbindelse med skabelsen og vedligeholdelsen af industrielle produktionsstammer.

Skimmelsvampe har i transformationsøjemedet det tilfælles med pattedyr og planteceller, at de er svære at foretage specifikke genmanipulationer i (gene targeting), da de introducerede DNA-stykker langt oftest indsætter sig ved IR [6,7,8]. Det besværliggør etableringen af mutantstammer, da screeningsarbejdet bliver meget omfattende. En succesfuld strategi, der har været flittigt benyttet i svampe til at forøge effektiviteten af genmanipulationer, er blokering af enzymaktiviteten for IR.

Herved elimineres en væsentlig del af de tilfældige integrationer af DNA, og effektiviteten af målrettede integrationer kan gå fra 1% til tæt på 100% [6,8].

I *A. nidulans* og andre svampe virker IR-defekte mutanter ikke synderligt påvirkede, ud over at de mangler et enzym i en vigtig reparationsmekanisme af DNA-skader, og de udviser ingen synlig fænotype.



Figur 3. Illegitim rekombination. Den store pil med grøn streg viser den simpleste form for samling i IR, hvorimod de andre pile viser former, der kræver flere aktiviteter. DNA-strengen i rød illustrerer en tilfældig samling af ender.

I pattedyr er denne mangel meget alvorlig for individets udvikling og immunforsvaret. Selvom denne kobling ikke er til stede i svampe, er der efterhånden gjort fund, der kan tyde på hurtigere ældning i IR-mutanter, og det frarådes at have en permanent IR-defekt som baggrund i en produktionsstamme [8]. Eksempelvis vil svampen anvende en backupversion af IR, der er kraftigt fejlbehæftet, når nøgleproteinerne i IR mangler (figur 3). Derudover er balancen mellem HR og IR normalt afstemt i kernen, så overdreven aktivitet af f.eks. HR kan give ustabilitet. ▶

Pipettecenteret

Kalibrering og service af alle fabrikater pipetter.

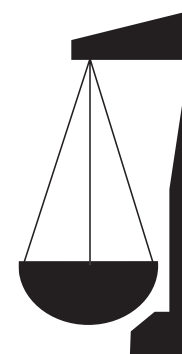
Vi kalibrerer både ved indsendelse eller på kundens adresse.

Salg af pipetter og laboratorie varer.

Nu også salg og service af vægte.



Pipettecenteret
Skovkanten 41 · 4700 Næstved
Tlf. 55 73 62 05 · Mobil 30 33 32 49
Email. nielslindgaard@stofanet.dk
www.pipettecenteret.dk



KEMIKRYDS

Se Kemikryds

Side 32 - 4-lodret

www.pumpegruppen.dk Tlf. +45 45 93 71 00 Fax +45 45 93 47 55

NY ELEKTRISK FADPUMPEMOTOR

- Regulerbar, 3.500-10.000 rpm.
- 650 W, 1x230 V, 50 Hz, IP24
- Nyudviklet "Quick Connection" til montering af motor på pumperør, uden brug af værktøj
- Indbygget overbelastningsbeskyttelse
- Konstrueret til kontinuerlig drift
- Passer til pumperør i PF, TBP og TBS serie

PUMPE GRUPPEN A/S

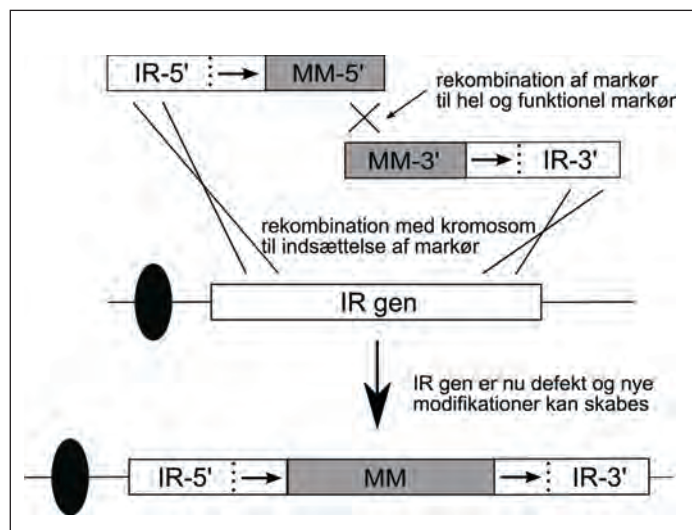
info@pumpegruppen.dk

A. nidulans har en velfungerende seksuel cyklus, hvilket åbner for et tilbagekryds til vildtype-funktion for IR-defekten og for andre opståede defekter. De imperfekte svampe, der tæller mange industristammer, har kun det asekuelle stadie og kan ikke redde sin defekt ved sex. Den tabte IR-funktion kan så reetableres ved transformation med det funktionelle IR-gen. Hvis det ikke sættes ind ved det oprindelige sted, så kan genspressionsniveauet f.eks. risikere at blive for lavt. Derfor kan det oprindelige sted vælges til genindsættelse, men IR-genet er ved transformation ofte splejset til et markørgen for at kunne finde de rigtige transformanter. Dette markørgen skal derefter elimineres fra cellen. Vi har på CMB, DTU udviklet et system i *A. nidulans*, hvor IR-funktionaliteten kan afbrydes og efterfølgende gendannes ved to simple selektionstrin, hvilket vil være til stor hjælp i gensplejsningen og arbejdet med imperfekte, men også seksuelle, svampe [1].

Transformationssystemet

Systemet er vist i figur 4 og 5 og bygger på anvendelsen af et modselekterbart selektionsmarkørgen, der indsættes i, og ikke fjerner det IR-gen, der ønskes sat ud af spil. Tilstedeværelsen af selektionsmarkøren i sig selv giver mulighed for at udvælge de korrekte kolonier efter transformation. Modselektionen får sin anvendelse, når der tilsættes en, til markørgenet tilhørende, antimetabolit til vækstmediet, og det bliver fatalt for celler, der indeholder markørgenet. Kun de kerner, der har tabt funktionen af markørgenet enten ved mutation eller ved loop-out af genet, vil overleve modselektionen.

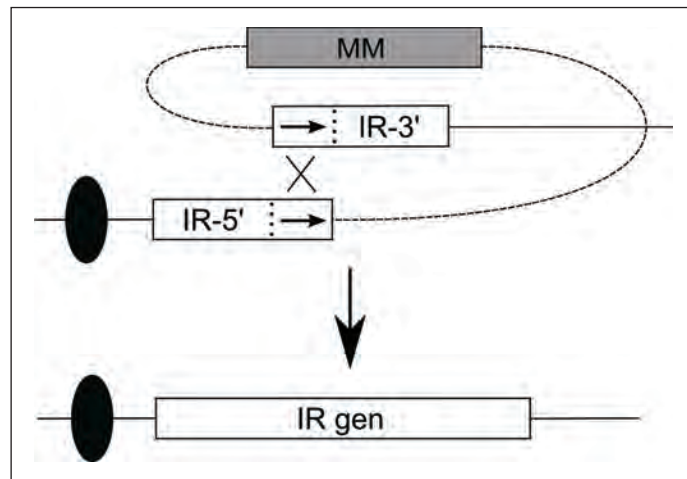
Selve DNA-stykkerne, der skal ind i cellen, består af tre komponenter, der på en enkelt dag kan produceres og samles ved to forskellige "polymerase chain reaction" (PCR)-metoder. En der laver enkeltprodukter, og en anden der samler dem. En komponent er det specielle modselekterbare markørgen, og da der ikke er mange enkelt-markørgener, der både kan selekteres for og



Figur 4. Transformation og afbrydelse af et IR-gens aktivitet med en modselektierbar markør (MM). DNA-stykker konstrueres via PCR og tilføres cellerne. Produkter rekombinerer med kromosomet (ses med sort kugle), og der søges efter transformantkolonier med funktionelt markørgen via selektion. Disse videreføres til nøje analyse på DNA-niveau for at bekræfte den korrekte hændelse.

imod, så kan markørkomponenten også bestå af to fusionerede markørgener, der tilsammen giver den ønskede effekt. De to andre komponenter er en øvre og nedre kopi af det IR-gen, der skal sættes ud af funktion ved rekombination. De to IR-genstykker indeholder en fælles midterdel af genet, der senere kan bruges til gendannelse af IR-genet via rekombination mellem de to

små repeterede sekvenser (figur 5). På figur 4 er der vist DNA-stykker med et opdelt markørgen, altså en øvre og en nedre del med en fælles overlappende sekvens, som er mere PCR-venligt [9,10]. Tilstedeværelsen af tre steder, der skal smeltes sammen (rekombinere) for succes i manipulationen, har vist sig at være mere effektiv til specifik genmanipulation i skimmelsvampe, end hvis markørgenet var helt intakt fra starten [7,8].



Figur 5. Dyrkning af IR-defekt mutantstamme med modselektion. Rekombination af repeterede genssekvenser for IR-genet genetablerer IR-genet til fuld funktionalitet og svampen overlever, da den har smidt markørgenet ud.

Imens markørgenet sidder i IR-genet, kan der foretages andre ønskede modifikationer af svampen, hvilket naturligvis kræver anvendelse af andre markørgener, end det der sidder i IR-genet. For iterative genmanipulationer vil brugen af endnu en modselektierbar markør være til stor nytte, da udvalget af selektionsmarkører ofte ikke er ubegrænset. Når IR skal gendannes, dyrkes svampen på vækstmedie inkl. antimetabolitten, hvilket resulterer i, at den ene gentagelse forsvinder sammen med den mellemliggende sekvens, der indeholder markørgenet, og det efterlader IR-genet intakt og funktionelt.

Afsluttende bemærkninger

Anvendelsen af det præsenterede system har vist sig at gøre det væsentlig lettere at foretage genetiske ændringer i skimmelsvampe, f.eks. optimering af stofskiftet med enkelte eller flere indgreb. Systemkonceptet er også blevet implementeret og demonstreret i andre arter. Udvikling af endnu flere genetiske markører til selektion og modselektion vil være værdifuldt for at kunne tilbyde et bredt virkende arsenal af markører, der effektivt dækker de individuelle behov i forskellige svampe.

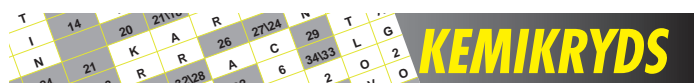
E-mail-adresse

Jakob Blæsbjerg Nielsen: jbn@bio.dtu.dk

Referencer:

- Nielsen, JB, Nielsen, ML, Mortensen, UH, 2008. Transiently disrupted non-homologous end joining pathway in *Aspergillus nidulans* allows simple and efficient gene targeting. *Fungal Genet Biol* 45: 165-170.
- Galagan, JE, Calvo, SE, Cuomo, C., Ma, LJ, Wortman, JR, Batzoglu, S, Lee, SI et al., 2005. Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature* 438(7071): 1105-1115.
- Meyer, V, 2008. Genetic engineering of filamentous fungi – progress, obstacles and future trends. *Biotechnol. Adv.* 26: 177-185.
- Pâques, F and Haber JE, 1999. Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63(2): 349-404.
- Daley, JM, Palmbos, PL, Wu, D, Wilson, TE, 2005. Nonhomologous end joining in yeast. *Annu. Rev. Genet.* 39: 431-51.

6. Ninomiya, Y, Suzuki, K, Ishii, C, Inoue, H, 2004. Highly efficient gene replacements in *Neurospora* strains deficient for nonhomologous end-joining. *PNAS* 101: 12248-12253.
7. Nielsen, ML, Albertsen, L, Lettier, G, Nielsen, JB, Mortensen, UH, 2006. Efficient PCR-based gene targeting with a recyclable marker for *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet Biol* 43: 54-64.
8. Nielsen, J B. Understanding DNA repair in *Aspergillus nidulans* – paving the way for efficient gene targeting. PhD. Thesis, May 2008.
9. Erdeniz, N, Mortensen, UH, Rothstein, R, 1997. Cloning-free PCR-based allele replacement methods. *Genome Res.* 7(12): 1174-1183.
10. Meyerhans, A, Vartanian, JP, Wain-Hobson, S, 1990. DNA recombination during PCR. *Nucleic Acids Res.* 18, 1687-1691.



Se Kemikryds

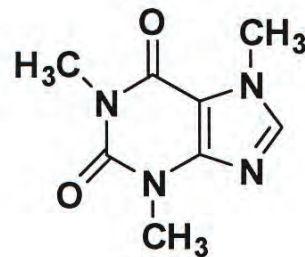


Side 32 - 15-lodret

Nyt om...

... Koffein og hallucinationer

Hvis du drikker mere end svarende til syv kopper kaffe om dagen, har du tre gange så stor risiko for at høre stemmer og se ting, der ikke er der, som hvis du drikker mindre end en kop om dagen. Af de 200 studerende, der udgjorde forsøgspersonerne, så nogle af-døde personer. Koffein stimulerer yderligere produktion af stress-hormonet cortisol, hvilket kan forårsage en øget tendens til at hallucinere.



Koffein

Koffeinforgiftning er karakteriseret ved ængstelse, irritabilitet, nervøsitet, muskelspændinger, søvnløshed og hovedpine. Forgiftningen ses sjældent ved indtagelse af under 250 mg koffein dagligt

Carsten Christophersen

Kilde: Caffeine, stress and psychosis-like experiences, Simon Jones og Charles Fernyhough *Personality and Individual differences*, Elsevier, December 2008.

NU ER VI EN ENDNU BEDRE INTERNATIONAL PARTNER FOR DIG. AWAPATENT OG INTERNATIONALT PATENT-BUREAU ER GÅET SAMMEN.

Det fusionerede selskab kommer til at hedde Awapatent og er allerede fra starten et af Europas absolut største konsulentbureauer inden for immaterialret med 350 medarbejdere – heraf 70 i Danmark.

Vi kan tilbyde kvalificeret IP-rådgivning inden for alle brancher samt alle juridiske og tekniske områder, hvor især kemi og bioteknologi er blevet styrket. Dermed får du som kunde hos os en endnu stærkere IP-partner ikke blot i Danmark og Europa, men i hele verden.

På www.awapatent.com kan du holde dig opdateret på IP-nyheder samt tilmelde dig vores nyhedsbreve.

 AWAPATENT®

 Internationalt Patent-Bureau

www.awapatent.com