

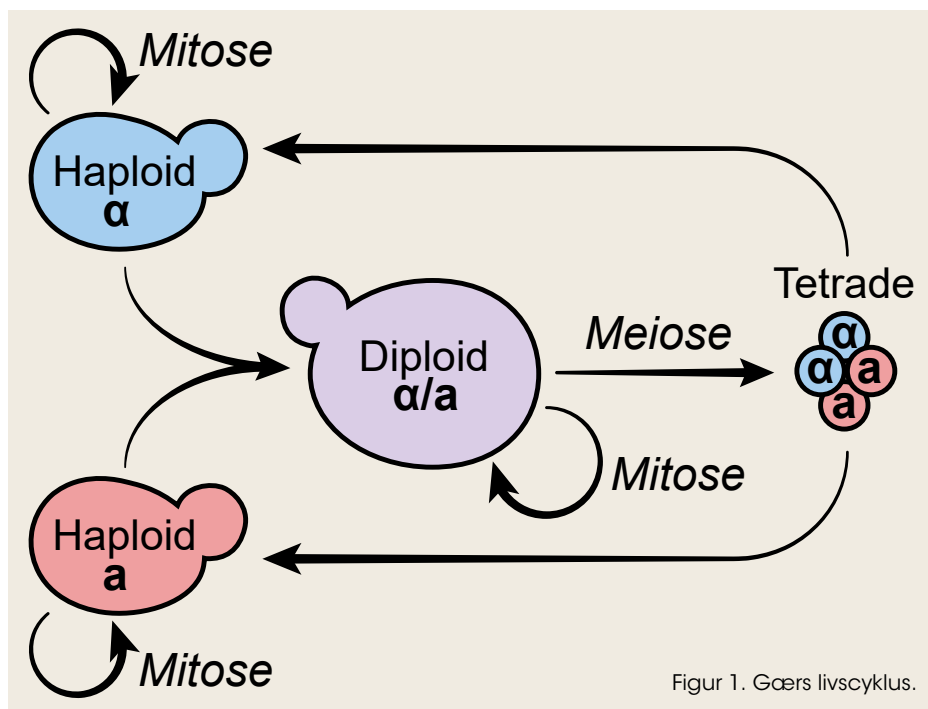
Moderne forskning kræver stammekonstruktion i high-throughput

Krydsning sætter endnu engang gær i førersædet som forsøgsorganisme.

Af Uffe Hasbro Mortensen, professor, Thomas Strucko, post doc, Morten Kielland-Brandt, professor emeritus, Institut for Bioteknologi og Biomedicin, DTU

En metode til kontrolleret krydsning etablerede gær som primær forskningsorganisme. Mange er nok klar over, at rendyrkning af gær, udviklet af Emil Christian Hansen på Carlsberg i årene 1881-1884 [1], er en milepæl i mikrobiologiens historie og en teknologi, der har bidraget markant til Carlsbergs succes. Det er måske mindre alment kendt, at Carlsberg i kraft af Øjvind Wings forskning i bagegærs (*Saccharomyces cerevisiae*) seksuelle cyklus har leveret endnu en historisk opdagelse, som reelt har betydet, at bagegær er den på mange måder bedst studerede eukaryot.

Haploide gærceller har en af to parningstyper ("køn"), a eller α , og i gærs seksuelle cyklus kan to haploide celler med modsat køn fusionere og danne en diploid celle (figur 1). Processen er dog kompliceret af, at haploide gærceller kan skifte køn, og en gærcelle i en haploid klon kan derfor altid finde en parringspartner. Det er godt for gær ude i den vilde natur, men i forskning er det en ulempe, da man ikke kan lave stabile haploide stammer til de ønskede krydsninger. Det var det problem, Winge løste, da han i 1949 [2] fandt en mutant, der ikke kunne skifte køn, og dermed satte scenen for kontrollerede genetiske eksperimenter med gær. Et gennembrud, der betød, at mange genetiske laboratorier verden over valgte *S. cerevisiae* som deres foretrukne modelorganisme for eukaryote-celler, og som har resulteret i flere nobelpriser.

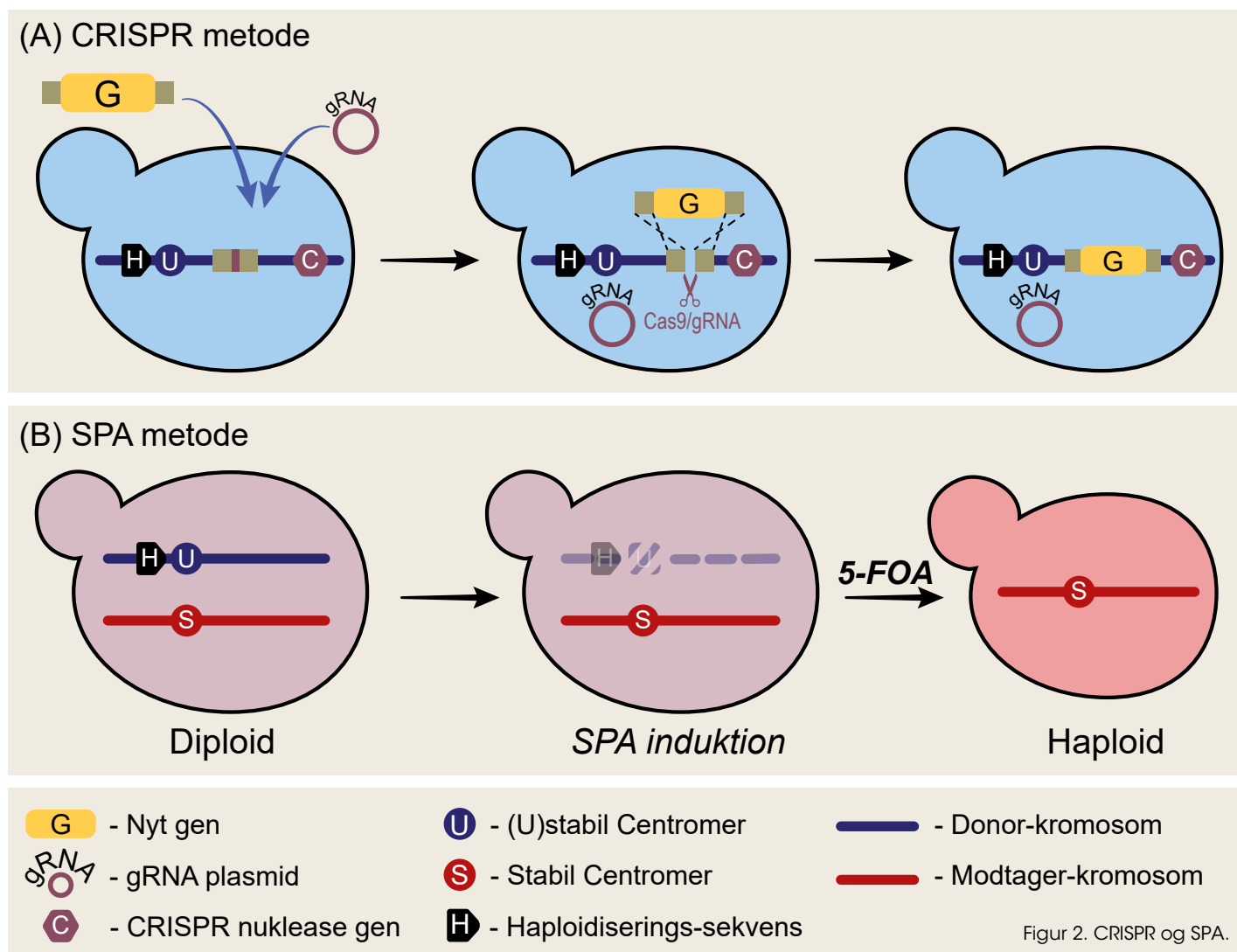


Figur 1. Gærs livscyklus.

Kontrolleret krydsning løser nu udfordringer i moderne forskning

Gærs status som forsøgsorganisme steg yderligere, da den blev den første eukaryote-organisme, hvor det var muligt målrettet at ændre specifikke geners sekvenser [3], og den første med et fuldt sekvenseret genom [4]. Disse to milepæle tilsammen muliggjorde konstruktionen af store definerede mutantbiblioteker, hvor alle gærs gener er blevet individuelt slettet eller overudtrykt [5,6], og med sådanne biblioteker er det potentielt muligt at bestemme samtlige geners effekt på en given proces og dermed få et overblik over, hvad der skal til for, at cellen kan udføre denne proces, noget enhver forsker drømmer om.

For eksempel er vi i vores laboratorium på DTU interesserede i at udnytte gær som cellefabrik for produkter til fødevarer- eller medicinalindustrien. Oftest er der tale om stoffer, som gær ikke selv kan lave, men som vi kan lære den at producere ved at indsætte et eller flere gener fra en organisme, der naturligt producerer stoffet. Når generne er sat ind i gær, får vi typisk et lavt udbytte, fordi den nye proces ikke er koordineret med gærs metabolisme og fysiologi. Det er dog umådeligt svært at forudsige, hvad problemerne er, og dermed også svært at løse dem. Det vil derfor være fantastisk nyttigt, hvis man kan studere processen individuelt i de mange mutantstammer og dermed få et overblik over, hvilke gener der påvirker processen.



En enorm eksperimentel flaskehals mod det mål er imidlertid, at man skal sætte de nye gener ind i de mange tusind mutantstammer. Med traditionelle metoder gør man det ved transformation. I gærs tilfælde vil det betyde, at samtlige stammer skal have en særlig behandling, der gør, at de er i stand til at optage DNA. Herefter skal det nye DNA indsættes i de mange stammer på præcis det samme sted i deres genom, så man meningsfuldt kan sammenligne udbytterne i de forskellige mutantstammer. Et sådant arbejde vil tage adskillige år, og det er her, Øjvind Winge kommer på banen igen. Tænk, hvis man kunne udnytte gærs naturlige parringsbiologi til at udføre denne opgave og lave alle stammerne i løbet af en uge. Det har vi opnået med vores nye teknik CRI-SPA [7,8].

Hvordan virker CRI-SPA?

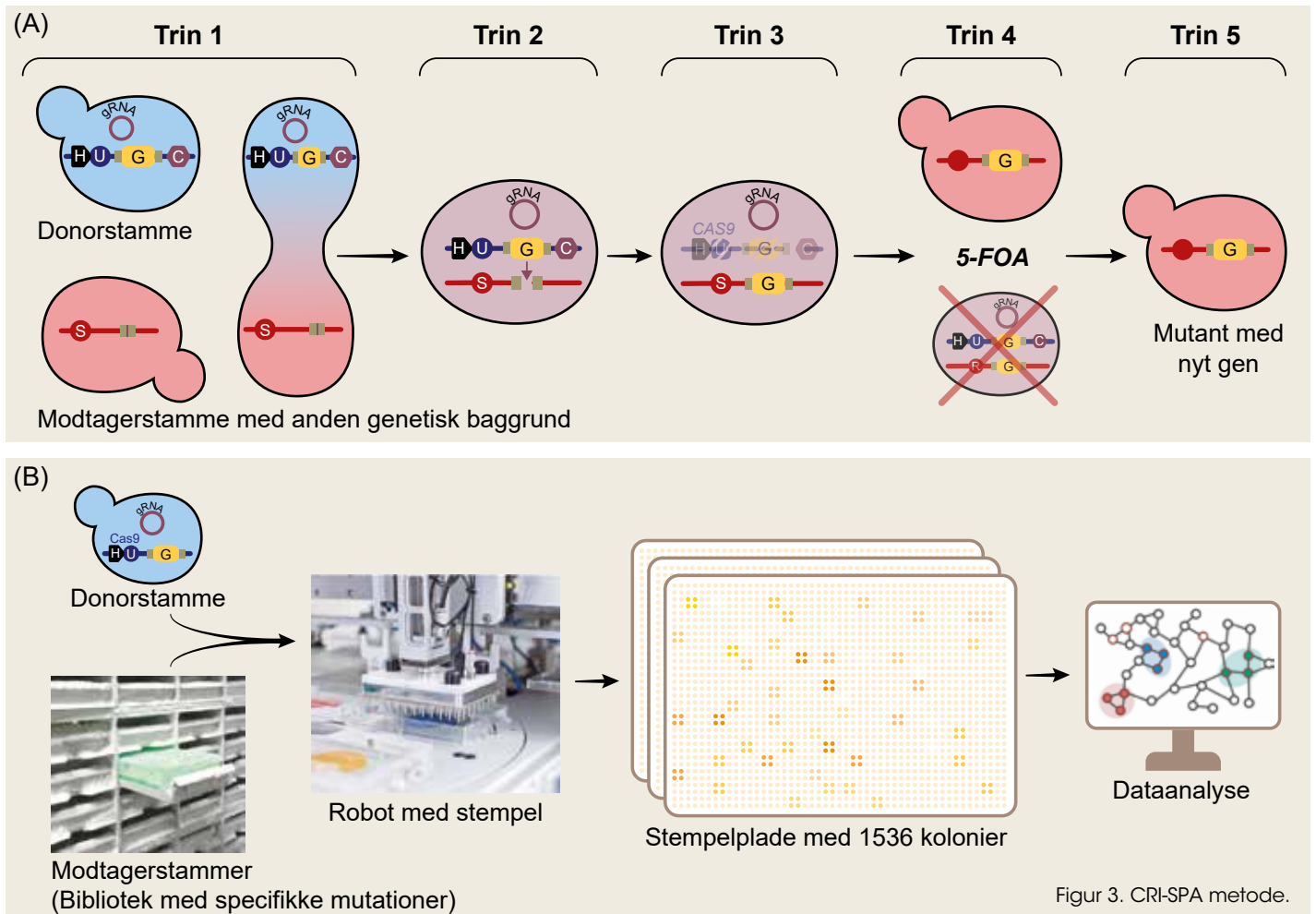
I CRI-SPA har vi slået to teknikker sammen: CRISPR, der gav Nobelprisen til Emmanuelle Charpentier og Jennifer Doudna i 2020, og Selective Ploidy

Ablation (SPA), der blev opfundet af Rodney Rothstein på Columbia University [9]. CRISPR-systemet er baseret på en nuklease, der kan introducere unikke DNA dobbeltstrengsbrud i en celledens genom. Det smarte ved CRISPR-nukleasen er, at dens specificitet bestemmes af sekvensen på en RNA-streng (guide RNA), der er indbygget i nukleasen. En forsker kan derfor let programmere CRISPR-nukleasens specificitet ved at redigere RNA-strengens sekvens og dermed bestemme, hvor genomet skæres. Dernæst kan forskeren udnytte, at en celle er god til at reparere bruddet ved hjælp af homolog rekombination, og hvis cellen forsynes med DNA, der matcher enderne af bruddet, vil cellen bruge det som lappetrej og indsætte det i bruddet, se figur 2A.

SPA bruges til at haploidisere en diploid celle. Det unikke ved systemet er, at det udelukkende er de kromosomer, der kommer fra den ene forældrestamme, der fjernes. Det opnår man ved, at alle kromosomerne i den ene forældrestamme har fået indsat en haploidiserings-

sekvens, som, når cellen gror på et bestemt medium, vil lede til, at alle kromosomerne destabiliseres og går tabt som funktion af celledelinger. Sekvensen indeholder også et gen, der medfører, at cellen dør, hvis man tilsætter stoffet 5-FOA til mediet. Man selekterer derfor nemt de celler, der har mistet alle de kromosomer, der har en haploidiseringssekvens, ved at dyrke alle cellerne på et medium med 5-FOA, figur 2B.

Ethvert CRI-SPA eksperiment er baseret på en universel haploid CRI-SPA stamme, der (i) har det modsatte køn i forhold til stammerne i mutantbibliotekerne, (ii) der har fået et CRISPR-nuklease gen, og (iii) hvori samtlige kromosomer er blevet forsynet med haploidiseringssekvensen. I denne universalstamme indsættes de ønskede nye gener på en kendt position i genomet ved hjælp af CRISPR-nukleasen. Indsættelsen ødelægger CRISPR-nukleasens genkendelsessekvens, og nukleasen vil ikke herefter klippe i genomet. Vi kalder denne stamme en CRI-SPA donorstamme.



Figur 3. CRI-SPA metode.

I et CRI-SPA eksperiment overføres de nye gener fra CRI-SPA donorstammen til alle stammerne i et mutantbibliotek via fem teknisk simple trin, se figur 3A, der blot involverer simpel replikaplading, hvor celler overføres fra en plade til en anden med et stempel. Da mutantbibliotekerne typisk har cirka 5-6000 stammer, og fordi hvert eksperiment skal laves fire gange for at opnå statistisk troværdige resultater, skal der laves 20-24.000 stammer. Et CRI-SPA eksperiment laves derfor bedst med en robot, figur 3B. For at holde antallet af plader nede bruger vi stempelplader, der kan håndtere 1536 kolonier, og dermed 384 forskellige mutantstammer.

I trin 1 blandes celler fra donorstammen individuelt med alle mutantstammerne på et medium, hvor de kan gro sammen og parre sig. I trin 2 overføres cellerne til et medium, hvor kun de diploide celler kan gro. Her vil CRISPR-nukleasen nu klippe mutantstammens genom på den position, der svarer til den, hvor de nye gener blev indsat i CRI-SPA universalstammens genom, før den blev til en CRI-SPA donorstamme. Cellen vil nu reparere bruddet ved at bruge information fra

donorstammen som lappegrej, og herved overføres de nye gener til den tilsvarende position i mutantstammens genom. I trin 3 overføres cellerne til et medium, hvor donorstammens kromosomer destabiliseres og tabes. I trin 4 overføres cellerne til medium med 5-FOA, der dræber alle de celler, der stadig indeholder et eller flere af donorstammens kromosomer. De overlevende celler er derfor identiske med de oprindelige mutantceller bortset fra, at de nu har de nye gener på den ønskede position. I trin 5 kan disse celler nu overføres til et medium, hvor mutationens effekt på den nye proces kan analyseres. De mange datapunkter kan nu samles i en systembiologisk model, som vil give et omfattende indblik i de relevante funktioner i cellen, og som man kan bruge som inspiration til strategien for optimering af cellefabrikken.

Ovenfor har vi beskrevet, hvordan CRI-SPA kan anvendes til optimering af cellefabrikker, men metoden kan selvfølgelig også bruges til at undersøge basale biologiske processer i en gær-celle.

E-mail:
Uffe Hasbro Mortensen: um@bio.dtu.dk

Kilder

- Hansen E.C. Undersøgelser over alkoholgjærsvampens fysiologi og morfologi. V. Metoder til fremstilling af renkulturer af saccharomyceter og lignende mikroorganismer. Meddelelser fra Carlsberg Laboratoriet (1886) 2(4):152-167.
- Winge Ø & Roberts C. A gene for diploidization in yeasts. Comptes Rendus des Travaux du Laboratoire Carlsberg. Serie Physiologique (1949) 24:341-346.
- Rothstein, R.J. One-step gene disruption in yeast. Methods in enzymology (1983), 101, 202-211.
- Goffeau A. et al. Life with 6000 genes. Science. (1996) 274, 563-567.
- Giaever G., et al. Functional profiling of the Saccharomyces cerevisiae genome. Nature (2002), 418, 387-391.
- Weill, U. et al. Genome-wide SWAp-Tag yeast libraries for proteome exploration. Nature Methods (2018) 15, 617-622.
- P. Cachera et al. CRI-SPA: a high-throughput method for systematic genetic editing of yeast libraries. Nucleic Acids Research. (2023) 51, e91.
- P. Cachera, N.C. Kurt, A. Röpke, T. Strucko, U.H. Mortensen & M.K. Jensen. Genome-wide host-pathway interactions affecting cis-cis-muconic acid production in yeast. Metabolic Engineering (2024) 83: 75-85.
- Reid, R.J. et al. Selective ploidy ablation, a high-throughput plasmid transfer protocol, identifies new genes affecting topoisomerase i-induced DNA damage. Genome Research. (2011) 21, 477-486.