

CRISPR/CAS

Schnelles und effizientes Genom-Editieren in *Aureobasidium*

CHRISTIAN ZIMMERMANN

INSTITUT FÜR VERFAHRENSTECHNIK, UMWELTECHNIK UND TECHNISCHE BIOWISSENSCHAFTEN, TU WIEN, ÖSTERREICH

The fungus *Aureobasidium pullulans* is used in the industry to produce pullulan and polyalate and possesses some outstanding properties such as polyextremotolerance and an unusual life cycle. This makes *A. pullulans* an interesting study object, for which we need an efficient genome editing method. This article describes how CRISPR/Cas can be used for this purpose. In particular, the usage of *in vitro* assembled ribonucleoproteins proved to be a fast and efficient method for genome editing.

DOI: 10.1007/s12268-024-2131-z
© Der Autor 2024

Der Pilz *Aureobasidium pullulans* wird biotechnologisch verwendet, um das Polysaccharid Pullulan und den Biopolyester Poly-malat zu produzieren [1]. *A. pullulans* kann aber noch mehr: Neben klassischen Pilz-Enzymen, wie Zellulasen, Laccase, Lipasen und Proteasen, verfügen manche *A. pullulans*-Stämme auch über Enzyme, die Kunststoffe abbauen können. Außerdem kann *A. pullulans* als lebender Schutz gegen Fäulnis eingesetzt werden. Obst, das mit *A. pullulans* besiedelt ist, ist effektiv gegen Verderbnis während der Lagerung geschützt [2].

Zusätzlich zu seinem großen Anwendungspotenzial ist der Pilz aber auch aufgrund einiger biologischer Besonderheiten interessant. *A. pullulans* ist ein polyextremotoleranter Pilz, der auch mit harschen Umweltbedingungen wie hohen Salzkonzentrationen und Strahlung zurechtkommt [3]. Außerdem verfügt *A. pullulans* über einen außergewöhnlichen Lebenszyklus, in dem sich ver-

schiedene Zellformen abwechseln. *A. pullulans* kann hefeartig (**Abb. 1A**) oder filamentös (**Abb. 1B**) wachsen, er kann aber auch geschwollene Zellen (**Abb. 1C**) bilden [4].

Unabhängig davon, ob wir uns mit der außergewöhnlichen Biologie oder dem Anwendungspotenzial von *A. pullulans* beschäftigen, brauchen wir eine effiziente Methode zur Genom-Editierung. Klassische Methoden für Genom-Editierungen in Pilzen sind relativ aufwändig und haben nur geringe Erfolgsraten. Wie schon in vielen anderen Organismen zuvor, hat das CRISPR/Cas9-System zu einer Revolution des Genom-Editieren in *Aureobasidium* geführt.

Das CRISPR/Cas-System schneidet DNA an bestimmten Sequenzen

Das CRISPR/Cas-System ist eine Art natürliches Immunsystem in Bakterien und Archaeen. Herzstück dabei ist die Endonuklease Cas9, die über einen RNA-Strang pro-

grammiert wird, und so DNA sequenzspezifisch zerschneiden kann. Für den gentechnischen Einsatz dieses Systems müssen nur das Cas9-Enzym und ein passender RNA-Strang (oft gRNA für *guide* RNA genannt) in eine Zelle eingebracht werden. Durch ein passendes Design der gRNA wird die Cas9 an die gewünschte Stelle dirigiert und schneidet die chromosomale DNA [5].

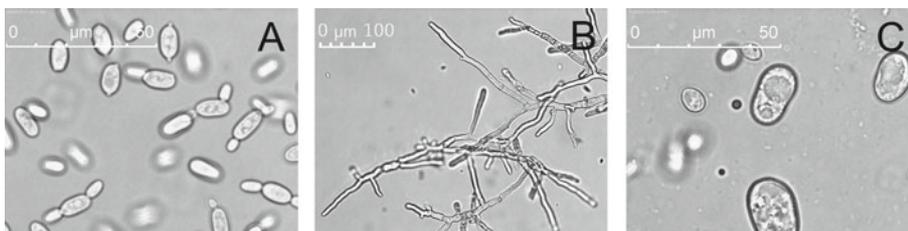
Nach dem Schnitt werden die freien DNA-Enden durch einen zelleigenen Reparaturmechanismus, dem *non-homologous end-joining* (NHEJ), wieder zusammengefügt (**Abb. 2**). Falls das NHEJ fehlerfrei vonstattengeht, wird die ursprüngliche Sequenz wieder hergestellt. Es können beim NHEJ jedoch auch Fehler passieren, die einen *frameshift* zur Folge haben. Das bedeutet, dass die Ribosomen bei der Translation des mRNA-Codes in den Protein-Code außerhalb des richtigen Leserahmens lesen, und so die falschen Aminosäuren bei der Proteinsynthese einbauen (**Abb. 2**).

Verschiedene Möglichkeiten zum Einbringen von Cas9 und gRNA

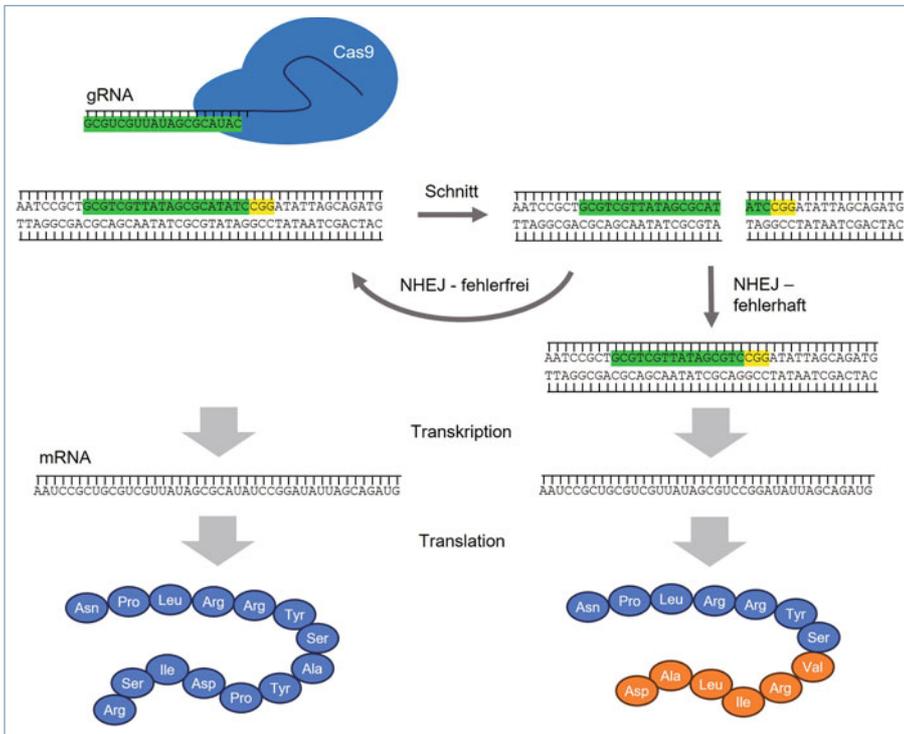
Einerseits ist es möglich ein Plasmid zu verwenden, auf dem sich die Gene für das Cas9-Protein und die gRNA befinden. Nach der Transformation werden Cas9 und gRNA durch das native Genexpression-System der Zielzelle synthetisiert. Dies ist normalerweise eine kostengünstige Methode, verlangt jedoch gewisse molekularbiologische Vorkenntnisse. Andererseits ist es möglich, die gRNA und das Cas9-Protein *in vitro* zusammenzufügen. Cas9 und gRNA finden sich zu einem Ribonukleoprotein (RNP) zusammen und werden dann in eine Zelle eingebracht. Die Vorteile von der RNPs sind die Schnelligkeit und eine Minimierung von *off-target*-Effekten. Für den Einsatz von CRISPR/Cas in *A. pullulans* haben wir uns deshalb für die RNP-Methode entschieden.

Direktes Genom-Editieren in *Aureobasidium* mit RNPs

Zum Austesten und Etablieren der Methode haben wir zunächst das Gen *URA3* als Ziel ausgewählt. *URA3* ist ein spezielles Gen, da



▲ **Abb. 1:** Der Pilz *Aureobasidium* kann zwischen verschiedenen Zelltypen wechseln. **A**, hefeartige Zellen. **B**, filamentöses Wachstum. **C**, geschwollene Zellen.



▲ **Abb. 2:** Nach dem Einbringen der RNPs in die Zelle schneidet Cas9 die DNA an einer Sequenz identisch zur gRNA (grün) vor einer PAM site (gelb). Durch NHEJ kann die DNA wieder repariert werden, es können dabei auch Fehler geschehen. Rechts ist eine kurze Deletion dargestellt, die später bei der Translation zu einem *frameshift* und damit zu einer falschen Aminosäuresequenz führt.

es ein bidirektionaler Marker ist. *URA3* codiert für die Orotidin-5'-Phosphat-Decarboxylase, ein Enzym, das an der Biosynthese der Pyrimidine beteiligt ist. Stämme ohne *URA3* können nicht ohne die Zugabe von Uracil oder Uridin überleben. Die Orotidin-5'-Phosphat-Decarboxylase verstoffwechselt aber auch 5-Fluororotsäure (5-FOA) zu dem Gift 5-Fluoruracil, weshalb wir auf die Abwesenheit oder einen Defekt von *URA3* mit 5-FOA selektionieren können [6]. Mithilfe der RNP-Methode konnten wir erfolgreich

das *URA3*-Gen in *A. pullulans* und dem nahen Verwandten *A. melanogenum* ausschalten [7].

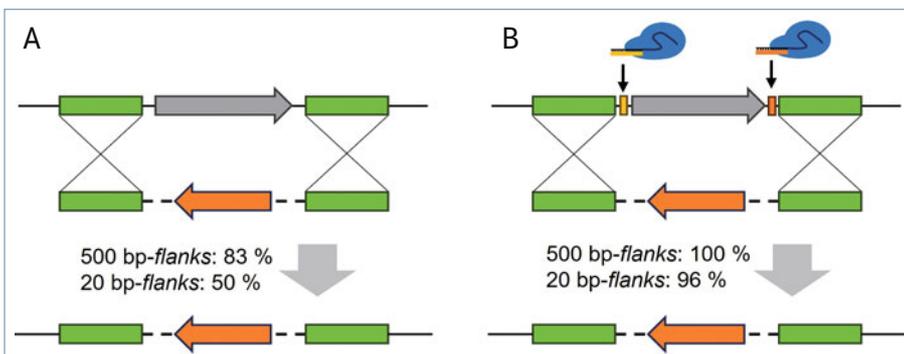
Als nächstes testeten wir, ob wir mit der RNP-Methode mehrere Gene gleichzeitig ausschalten können. Dafür benutzten wir zwei verschiedene gRNAs. Eine dirigierte dabei Cas9 zum Anfang des *URA3*-Gens und die zweite gRNA zu einem zweiten Gen. Diese Methode nennt sich Multiplex-Genom-Editieren. Wir selektionierten wieder mit 5-FOA auf das Ausschalten von *URA3* und überprüf-

ten dann, ob das zweite Gen auch ausgeschaltet wurde. Dabei konnten wir für die Gene *ADE2* und *ARG4*, die an der Adenin-beziehungsweise Arginin-Synthese beteiligt sind, Erfolgsraten von 1 aus 6 (16,7 %) beziehungsweise 1 aus 24 (4,2 %) erzielen [7]. Die RNP-Methode kann also erfolgreich für einfaches und Multiplex-Genom-Editieren in *Aureobasidium* benutzt werden. Der Einsatz von RNPs ist eine schnelle und effiziente Methode, um Gene auszuschalten, kann jedoch nicht für gezielte Modifikationen, Überexpression oder gar heterologe Deletionen benutzt werden.

Klassisches Genom-Editieren hat geringe Integrationsraten

Die herkömmliche Strategie für diese Art von genetischen Modifikationen in Pilzen beruht auf homologer Rekombination, bei der zwei identische DNA-Stücke physikalisch gekreuzt werden (Crossover). Dafür wird zunächst eine genetische Kasette konstruiert, bei der ein Markergen zwischen zwei flankierenden Sequenzen eingebaut wird. Die flankierenden Sequenzen sind identisch zum Zielabschnitt im Genom. Durch einen Doppel-Crossover wird das Markergen ins Genom integriert – es ersetzt dabei den normalerweise im Genom vorkommenden DNA-Abschnitt (**Abb. 3A**). Nach der Transformation wird auf die Anwesenheit des Markers selektioniert. Auf diese Weise können Gene deletiert werden [8].

Für homologe Rekombination und damit Crossovers muss eine Reihe von speziellen Enzymen und Proteinen gezielt miteinander und mit der DNA interagieren. Homologe Rekombination spielt während der sexuellen Vermehrung eine große Rolle, da so die Genome von zwei verschiedenen Individuen gemischt werden können. Im vegetativen Lebenszyklus können mit homologer Rekombination Schäden an der DNA repariert werden. Die meisten Pilze bedienen sich allerdings lieber des zuvor erwähnten NHEJ, um DNA-Schäden zu reparieren. Dadurch werden in den meisten Pilzen DNA-Kassetten nicht an der gewünschten Stelle im Genom, sondern an einer zufälligen Position integriert [8]. In anderen Pilzen und Organismen konnte mithilfe des CRISPR/Cas-Systems die Integrationsrate erhöht werden. Dabei wird an der gewünschten Stelle im Genom ein DNA-Schnitt durchgeführt und somit die Reparaturmaschinerie an die richtige Stelle gelotst.



▲ **Abb. 3:** Durch ein Doppel-Crossover an den flankierenden Sequenzen (grün) kann ein Gen durch ein Markergen (orange) ersetzt und somit deletiert werden. Abhängig von der Länge der flankierenden Sequenzen (*flanks*) und der Ab- oder Anwesenheit (A oder B) gibt es unterschiedliche Integrationsraten.

RNPs erhöhen die Integrationsrate auf bis zu 100 Prozent

Um auszutesten, ob CRISPR/Cas auch in *Aureobasidium* verwendet werden kann, um die Integrationsrate bei homologer Rekombination zu erhöhen, brachten wir eine klassische Genkassette in *A. pullulans* ein und benutzten zusätzlich RNPs (**Abb. 3B**). Die Deletionskassette besteht aus flankierenden Sequenzen von etwa 500 bp Länge und dem Markergen *pyr4*. Das Gen *pyr4* kann die Funktion von *URA3* in *Aureobasidium* ersetzen [7]. Als Empfängerstamm für die Transformationen benutzten wir einen Stamm, in dem der Mittelteil von *URA3* fehlt. Ohne RNPs konnten wir eine 83 %ige Integrationsrate erreichen. Mit RNPs erhöhte sich die Integrationsrate auf 100 % (bei 24 getesteten Kandidaten). Ein kleiner Wermutstropfen hierbei war jedoch die Länge der flankierenden Sequenzen. Bei einer Länge von 500 bp muss die Deletionskassette durch Klonierung konstruiert werden, was etwa zwei bis drei Wochen dauert.

Um diesen Prozess zu beschleunigen, versuchten wir die Transformation mit Deletionskassetten mit kurzen flankierenden Sequenzen (nur 20 bp), da diese leicht mit einer PCR (Polymerasekettenreaktion) hergestellt werden können. Das dauert nur ein bis zwei Tage und stellt somit eine erhebliche Zeitersparnis dar. Mit diesen kurzen flankie-

renden Sequenzen konnten wir ohne RNPs eine Integrationsrate von 50 % erreichen, mit RNPs 96 % (22 von 23 getesteten Kandidaten, [7]). Mithilfe der RNPs und dem Einsatz von Deletionskassetten mit kurzen flankierenden Sequenzen, können mit dieser Methode innerhalb einer Woche Gendeletionen und Integrationen in *Aureobasidium* durchgeführt werden. Außerdem können wegen des geringen Aufwands zur Vorbereitung leicht mehrere genetische Modifikationen parallel durchgeführt werden.

Danksagung

Diese Forschung wurde teilweise durch den Wissenschaftsfonds FWF finanziert [P 35642]. Zum Zweck des freien Zugangs hat der:die Autor:in für jedwede akzeptierte Manuskriptversion, die sich aus dieser Einreichung ergibt, eine „Creative Commons Attribution CC BY“-Lizenz vergeben. ■

Literatur

- [1] Prasongsuk S, Lotrakul P, Ali I et al. (2018) The current status of *Aureobasidium pullulans* in biotechnology. *Folia Microbiol (Praha)* 63: 129–140
- [2] Vero S, Garmendia G, González MB et al. (2009) *Aureobasidium pullulans* as a biocontrol agent of postharvest pathogens of apples in Uruguay. *Biocontrol Sci Technol* 19: 1033–1049
- [3] Gostiñar C, Turk M, Zajc J et al. (2019) Fifty *Aureobasidium pullulans* genomes reveal a recombining poly-extremotolerant generalist. *Environ Microbiol* 21: 3638–3652
- [4] Slepecky RA, Starmer WT (2009) Phenotypic plasticity in fungi: a review with observations on *Aureobasidium pullulans*. *Mycologia* 101: 823–832
- [5] Hsu Patrick D, Lander Eric S, Zhang F (2014) Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering. *Cell* 157: 1262–1278

- [6] Rose K, Liebergesell M, Steinbüchel A (2000) Molecular analysis of the *Aureobasidium pullulans ura3* gene encoding orotidine-5'-phosphate decarboxylase and isolation of mutants defective in this gene. *Appl Microbiol Biotechnol* 53: 296–300
- [7] Kreuter J, Stark G, Mach RL et al. (2022) Fast and efficient CRISPR-mediated genome editing in *Aureobasidium* using Cas9 ribonucleoproteins. *J Biotechnol* 350: 11–16
- [8] Tomico-Cuenca I, Mach RL, Mach-Aigner AR et al. (2021) An overview on current molecular tools for heterologous gene expression in *Trichoderma*. *Fungal Biol Biotechnol* 8: 11

Funding note: Open access funding provided by TU Wien (TUW).
Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.



Korrespondenzadresse:

Dr. Christian Zimmermann
 Technische Universität Wien
 Institut für Verfahrenstechnik, Umwelttechnik
 und Technische Biowissenschaften
 Gumpendorfer Straße 1a
 A-1060 Wien
christian.zimmermann@tuwien.ac.at