



UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Matija HROVATIN

**UPORABA TEHNOLOGIJE CRISPR-Cas9 V
METABOLNEM INŽENIRINGU**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij - 1. stopnja

Ljubljana, 2020

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Matija HROVATIN

**UPORABA TEHNOLOGIJE CRISPR-Cas9 V METABOLNEM
INŽENIRINGU**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij - 1. stopnja

**USE OF CRISPR-Cas9 TECHNOLOGY IN METABOLIC
ENGINEERING**

B. SC. THESIS
Academic Study Programmes

Ljubljana, 2020

Diplomsko delo je zaključek Univerzitetnega študijskega programa prve stopnje Biotehnologija.

Študijska komisija 1. in 2. stopnje študija biotehnologije je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Uroša Petroviča.

Komisija za oceno in predstavitev:

Predsednik: prof. dr. Mojca NARAT
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Uroš PETROVIČ
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Član: prof. dr. Polona JAMNIK
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum predavitve: 2.9.2020

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Du1
DK	UDK 606:62:602.6:578/579 601.4:577.21(043.2)
KG	metabolni inženiring, CRISPR-Cas9, celične tovarne, preurejanje genoma
AV	HROVATIN, Matija
SA	PETROVIČ, Uroš (mentor)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, Univerzitetni študijski program prve stopnje Biotehnologija
LI	2020
IN	UPORABA TEHNOLOGIJE CRISPR-Cas9 V METABOLNEM INŽENIRINGU
TD	Diplomsko delo (Univerzitetni študij - 1. stopnja)
OP	VI, 20 str., 4 sl., 24 vir.
IJ	sl
JI	sl/en
AI	Za proizvodnjo širokega spektra produktov se uporabljajo celične tovarne, ki lahko kot vir energije uporabljajo obnovljive vire in odpadke. Optimizacija delovanja celičnih tovarn je možna z metabolnim inženiringom. Ena od metod je sistem CRISPR-Cas9, ki učinkovito uvede zelene spremembe v genom tarčnega organizma. Običajno s sistemom CRISPR-Cas9 izvedemo delecije, insercije ter spremembe tarčnih genov tako, da povečamo metabolni pretok skozi tarčne metabolne poti. Dobimo učinkovito celično tovarno, ki proizvaja velike količine tarčnega produkta. Tehnologijo CRISPR-Cas9 odlikuje visoka natančnost uvedbe sprememb, enostavnost, hitrost in nizka cena. V diplomski nalogi sem opisal aktualne uporabe tehnologije CRISPR-Cas9 za namen metabolnega inženiringa in izdelavo učinkovitih sevov mikroorganizmov, ki imajo velik potencial za uporabo v živilski, kozmetični in kemijski industriji ter v proizvodnji zdravil in biogoriv. Metabolni inženiring je ključnega pomena za nadaljnji razvoj in proizvodnjo produktov s celičnimi tovarnami.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du1

DC UDC 606:62:602.6:578/579 601.4:577.21(043.2)

CX Metabolic engineering, CRISPR-Cas9, cell factories, genome modification

AU HROVATIN, Matija

AA PETROVIČ, Uroš (supervisor)

PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101

PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Academic Study Programme in Biotechnology

PY 2020

TI USE OF CRISPR-Cas9 TECHNOLOGY IN METABOLIC ENGINEERING

DT B. Sc. Thesis (Academic Study Programmes)

NO VI, 20 p., 4 fig., 24 ref.

LA sl

AL sl/en

AB Cell factories are applicable for production of a wide range of products from renewable sources and waste materials as an energy source. Optimization of cell factories operation conditions is further possible with metabolic engineering. One of the methods to achieve this is the CRISPR-Cas9 technology, which effectively introduces the desired changes to the genome of the target organism. Typically, deletions, insertions and other manipulations of target genes are performed with the CRISPR-Cas9 with the aim to increase metabolic flux through the target metabolic pathways. Using this approach, large quantities of the target product is synthesised through an environmentally benign process, via efficient cell factories. The advantages of CRISPR-Cas9 are high precision of genetic changes at targeted loci, simplicity, speed and economic efficiency of the process. In this thesis I will describe the state-of-the-art applications of CRISPR-Cas9 technology in metabolic engineering. I will also address production of efficient cell lines with potential applications in various fields such as food, cosmetic and chemical industry, production of biofuels and pharmaceuticals. Metabolic engineering is a key factor for the further development and manufacturing of desired products with cell factories.

KAZALO VSEBINE

	Str.
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO SLIK	VI
1 UVOD	1
1.1 NAMEN DELA	1
2 METABOLNI INŽENIRING	1
2.1 RAZVOJ CELIČNIH TOVARN Z UPORABO METABOLNEGA INŽENIRINGA	2
3 TEHNOLOGIJA CRISPR-Cas9	4
3.1 ODKRITJE SISTEMA CRISPR-Cas9	4
3.2 DELOVANJE SISTEMA CRISPR-Cas9	5
3.3 PREDNOSTI IN SLABOSTI SISTEMA CRISPR-Cas9	6
4 UPORABA TEHNOLOGIJE CRISPR-Cas9 V METABOLNEM INŽENIRINGU	6
4.1 BIOGORIVA	6
4.1.1 Bioetanol	6
4.1.2 Izoprenoidi	7
4.2 BIOPOLIMERI	9
4.2.1 Polihidroksialkanoati (PHA)	9
4.2.2 Poli (3-hidroksibutirat-ko-3-hidroksivalerat) (PHBV)	10
4.3 MIKROBNA BARVILA	12
4.3.1 β-karoten	12
4.4 AROME	13
4.4.1 Aroma hmelja	14
4.4.2 Valencen	15
4.5 TERAPEVTSKE MOLEKULE	16
4.5.1 Artemisinin	16
5 ZAKLJUČEK	17
6 VIRI	18
ZAHVALA	

KAZALO SLIK

	Str.
Slika 1: Delovanje sistema CRISPR-Cas9	5
Slika 2: Metabolna pot PHBV	11
Slika 3: Biosintezna pot β -karotena	13
Slika 4: Metabolna pot artemisinske kisline	17

1 UVOD

Metabolni inženiring omogoča izdelavo in optimizacijo celičnih tovarn za proizvodnjo različnih produktov, kot so goriva, kemikalije, prehranski dodatki in zdravila. Da pridobimo mikroorganizme, ki proizvajajo zelene snovi, moramo velikokrat njihovo metabolno in regulatorno mrežo spremeniti. S tem tudi izboljšamo produktivnost ter izkoristek. Proces izdelave takšnega seva oziroma celične linije za uporabo na industrijski ravni je zahteven in dolgotrajen postopek (Lian in sod., 2018).

Z metabolnim inženiringom lahko povečamo ali zmanjšamo stopnjo izražanja določenih genov, zvišamo učinkovitost sinteze encimov, ki omejujejo sintezo metabolitov, utišamo metabolne poti, lahko pa tudi dodajamo nove biosintetske poti. Iz tega je razvidno, da je ključna lastnost, ki vpliva na uspešnost metabolnega inženiringa, sposobnost manipulacije gostiteljevega genoma (Lian in sod., 2018).

Nedavno razvita tehnologija CRISPR-Cas9 omogoča urejanje genoma. CRISPR je bil odkrit kot del obrambnega sistema, ki so ga bakterije razvile za boj proti virusom. Bakterije lahko shranijo dele DNA virusa, ki jih je napadel, kar jim omogoča v prihodnosti v naprej prepoznati enak virus (Hsu in sod., 2014). To sposobnost vgraditve tuje DNA v genom so znanstveniki, z nekaj spremembami, uporabili za spreminjanje genoma različnih organizmov. Tehnologija CRISPR-Cas9 je povzročila revolucijo v znanstvenih pristopih in raziskavah na področju metabolnega inženiringa, saj omogoča natančno spreminjanje in posledično optimiziranje genoma živih bitij. Ta metoda je zaradi svoje relativno preproste uporabe, natančnosti in učinkovitosti ena izmed najbolj uporabljenih tehnologij za urejanje genoma.

1.1 NAMEN DELA

Namen diplomskega dela je pregled literature in preučitev različnih načinov uporabe tehnologije CRISPR-Cas9 za namen metabolnega inženiringa. Predstavil bom tudi primere produktov, kjer je bila uporabljena tehnologija CRISPR-Cas9 za metabolni inženiring njihovih metabolnih poti.

2 METABOLNI INŽENIRING

Metabolni inženiring se ukvarja z neposredno izboljšavo celičnih lastnosti z namenom povečanja produkcije tarčnega metabolita, preko sprememb v biokemijskih poteh ali vnosa novih metabolnih poti, z uporabo tehnologije rekombinantne DNA. Zavedati se moramo, da je proizvodnja učinkovitih celičnih tovarn zahteven proces, saj so celice tekom evolucije razvile robustna in visoko regulirana metabolna omrežja z veliko interakcijami (Nielsen in Keasling, 2016). Celične tovarne so celične linije ali sevi mikroorganizmov, ki so narejene z namenom proizvodnje velikih količin tarčnega produkta.

Metabolni inženiring se uporablja predvsem za izboljšanje že obstoječih procesov, vedno več pa se uporablja za razvoj novih bioprocov za proizvodnjo novih molekul (Nielsen in Keasling, 2016). Biosinteza omogoča uporabo naravnih, obnovljivih virov energije in ogljika (npr. škrob, celuloza, lignoceluloza in saharoza), napram tradicionalni kemični sintezi, ki se zanaša na fosilna goriva. Poleg tega zamenjava kemične sinteze z biosintezo vodi do manjšega onesnaženja in manjše porabe energije. Biosinteza je zato okolju prijaznejši proces kot kemična sinteza.

Najpogostejše metode metabolnega inženiringa vključujejo povečanje oziroma modifikacijo encimske aktivnosti, vnos genov za druge encime, vnos novih metabolnih poti in/ali delecija že obstoječih.

2.1 RAZVOJ CELIČNIH TOVARN Z UPORABO METABOLNEGA INŽENIRINGA

Razvoj celične tovarne se začne z identifikacijo tarčne molekule in določitvijo metabolne poti. Če se metabolna pot nahaja v že obstoječem organizmu, se pogosto odločimo za izboljšavo le-tega. Če metabolne poti ni v ustreznem organizmu, jo lahko izgradimo oziroma prestavimo (rekonstruiramo) iz že obstoječega organizma v boljši, ustrežnejši produkcijski organizem. Kot produkcijski organizmi se pogosto uporabljajo modelni organizmi, kot so: *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli*, *Aspergillus niger*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium glutamicum* in celice CHO (ang. *Chinese hamster ovary cells*). Na koncu je potrebno optimizirati še titer (končna koncentracija tarčnega metabolita), produktivnost in izkoristek procesa (angl. *titer, rate, yield*; TRY) (Nielsen in Keasling, 2016).

Razvoja in optimizacija celične tovarne poteka v ciklih, sestavljenih iz štirih sklopov: 1.) načrtovanje (oblikovanje), 2.) izgradnja, 3.) testiranje in 4.) izboljšanje (angl. *Design-Build-Test-Learn Cycle*).

V načrtovanju metabolne poti se moramo najprej odločiti, kateri organizem bomo uporabili za proizvodnjo tarčnega metabolita, na podlagi začetnih substratov. Pri tem upoštevamo toksičnost ciljnega metabolita, pogoje, pri katerih bo organizem proizvajal želen metabolit, ter pogoje, pri katerih ga bomo izolirali in očistili (pH, temperatura, ionska jakost,...). V naslednji fazi je potrebna identifikacija ustreznih encimov, ki jih bomo uporabili v metabolni poti za proizvodnjo končnega metabolita, pri čemer si pomagamo z modeliranjem s številnimi računalniškimi programi in z bazami podatkov (Nielsen in Keasling, 2016).

Sledi izgradnja in optimizacija že obstoječe metabolne poti. V tem koraku je glavni cilj povečati metabolni pretok skozi osrednje metabolne poti. S tem povečamo koncentracijo intermediatov, iz katerih se izgradi tarčni metabolit. Ena izmed pomembnejših strategij metabolnega inženiringa za povečanje metabolnega pretoka v smeri tarčnega metabolita, je

proteinski inženiring. S proteinskim inženiringom spreminjamo lastnosti encimov za želeno uporabo. Želimo narediti encime, ki so stabilni, visoko produktivni in odporni na zunanje dejavnike (temperatura, pH, ionska jakost), pogosto tudi odstranimo potrebo po kofaktorjih. Želimo tudi, da so encimi topni v ne-vodnih topilih in da so visoko specifični za določen substrat, iz katerega nastaja tarčen metabolit. Najpogostejši metodi za proteinski inženiring sta racionalni inženiring in neposredna evolucija. Pri racionalnem inženiringu poznamo strukturo encima, aktivno mesto in izvajamo tarčno spremembo. Pri neposredni evoluciji ne poznamo strukture encima in izvajamo naključne mutacije. Za povečanje metabolnega pretoka se pogosto uporablja tudi metoda, kjer odstranimo inhibicijo encima s povratno zanko. Pri tem mutiramo aktivno mesto encima tako, da na encim ne vpliva več povratna zanka in posledično encim ni več inhibiran.

Znane so tudi druge strategije metabolnega inženiringa za povečanje metabolnega pretoka in končnih produkcijskih titrov. Na optimizacijo metabolnega pretoka lahko vplivamo s preusmerjanjem in spreminjanjem metabolnih poti (Yang in sod., 2020). Za povečanje metabolnega pretoka in izdelave čim več zelenih intermediatov, ki so potrebni za izgradnjo ciljnega metabolita, lahko znižamo delovanje metabolnih poti, ki porabljajo zelene intermediate za produkcijo ne-tarčnih metabolitov. Za povečanje koncentracije ustreznih intermediatov je pomemben uravnotežen donos kofaktorjev, ki omogočajo pravilno delovanje encimov. Druga možnost za povečanje metabolnega pretoka je tudi prekomerno izražanje genov, kjer uporabimo močnejše promotorje ali pa mesta vezave ribosomov spremenimo tako, da imajo ribosomi večjo afiniteto do mRNA (Yang in sod., 2020).

Po načrtovanju in izgradnji metabolne poti je potrebno izvesti teste učinkovitosti. V tem koraku ovrednotimo uspešnost izgradnje ter preverimo ustreznost in uspešnost modifikacij metabolnih poti (delecije in integracije ustreznih genov). Sledi testiranje rasti in fiziološko karakteriziranje celic, kjer preverimo lastnosti samih celic (Nielsen in Keasling, 2016). Za namene analiz se poslužujemo transkriptomike, proteomike in metabolomike, ki nam omogočijo analizo specifičnih metabolnih poti, prisotnost določenih metabolitov in ekspresijo specifičnih genov.

V zadnjem sklopu cikla *Design-Build-Test-Learn* izvedemo izboljšave na podlagi znanja, ki smo ga pridobili tekom celotnega procesa. Z opazovanjem ter izkušnjami pogosto zasledimo napake v predhodnih poizkusih, katere odpravimo in tako izboljšamo delovanje celične tovarne.

Razvoj visoko učinkovite celične tovarne, ki proizvaja tarčno molekulo, je dolgotrajen. Glavni razlog za dolg razvoj je potreba po konstruiranju velikega števila različnih celičnih linij oziroma sevov, njihovega okarakteriziranja in testiranja. Večina celičnih linij ter sevov, ki se uporabljajo na industrijski ravni proizvodnje, potrebuje številne genetske modifikacije tako tarčnih metabolnih poti, kot tudi ne-tarčnih poti za učinkovito preusmeritev metabolnega

pretoka (Nielsen in Keasling, 2016). Manipulacija metabolizma običajno vsebuje delecije, insercije, prekomerno izražanje genov, pa tudi istočasno mutacijo večih genov. Ti postopki so običajno dolgotrajni, saj zahtevajo visoko natančnost ter veliko testov za doseg želenih rezultatov. Danes se vedno več uporablja sistem CRISPR, ki omogoči vnos številnih mutacij na točno določenih mestih, v relativno kratkem času. Metoda je cenovno ugodna in pospeši proces izdelave celičnih tovarn.

3 TEHNOLOGIJA CRISPR-Cas9

3.1 ODKRITJE SISTEMA CRISPR-Cas9

Leta 1987 je skupina znanstvenikov pod vodstvom Yoshizumi Ishina iz Osake, Japonska, odkrila del bakterijske DNA (iz *Escherichia coli*), v katerem je bilo 5 ponovitev istega zaporedja 29-ih nukleotidov. Posamezni nukleotidni odseki so bili prekinjeni z 32 nukleotidov dolgimi odseki DNA, ki so se med seboj razlikovali. Znanstveniki česa takšnega pri bakterijah do tedaj še niso opazili. V nadaljnjih raziskavah so opazili enaka zaporedja tudi pri drugih vrstah bakterij in številnih vrstah arhej. To zaporedje so poimenovali CRISPR (gruča enakomerno prekinjenih kratkih palindromnih ponovitev, ang. Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) (Mojica in sod., 2000; Hsu in sod., 2014).

Z uporabo primerjalnih študij so znanstveniki ugotovili, da so variabilni deli v zaporedjih CRISPR v resnici deli virusne DNA (Mojica in sod., 2005). Iz vseh teh ugotovitev so sklepali, da je CRISPR v resnici del obrambnega sistema, ki so ga bakterije razvile za boj proti virusom. Bakterije shranijo dele DNA virusa, ki jih je napadel, ter lahko v prihodnosti predhodno prepoznajo enak virus. Tako je bakterija bolj pripravljena na napad enakega virusa.

V bližini zaporedij CRISPR so odkrili s CRISPR povezane gene (angl. *CRISPR associated genes*, Cas), ki nosijo zapis za proteine Cas. Ti proteini imajo endonukleazno aktivnost in so torej sposobni razreza dvojne vijačnice DNA.

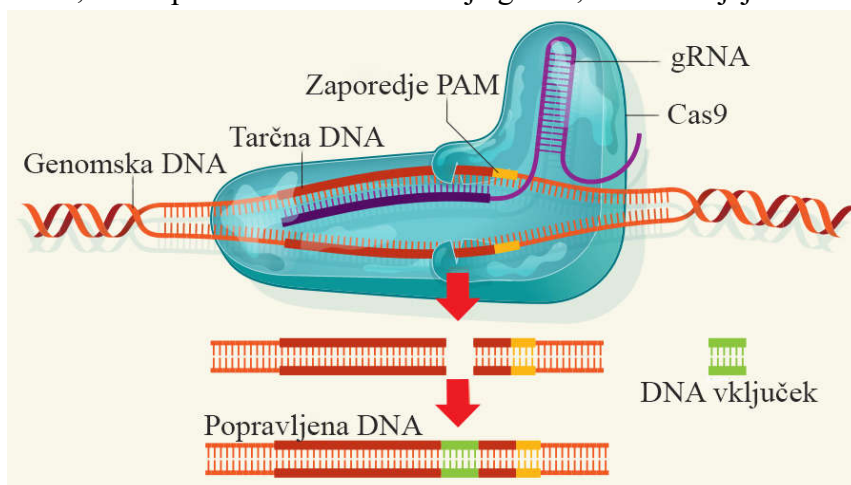
Proteini Cas povzročijo dvovertični prelom molekule DNA na točno določenem mestu. To mesto natančno določi ustrezna RNA, ki nastane na podlagi virusne DNA v genomu bakterije. Ta RNA se vgradi v encime Cas9. Nato encim z ugnezdeno RNA potuje po celici in se poskuša vezati na vsako DNA, ki jo najde. Če se zaporedje RNA na encimu ujema z najdeno DNA, se ta DNA razreže in posledično uniči. Tako CRISPR-Cas9 sistem učinkovito brani bakterije pred napadom virusov.

3.2 DELOVANJE SISTEMA CRISPR-Cas9

CRISPR je zaporedje s ponavljajočimi se elementi, ki jih je organizem integriral po stiku s tujimi genetskimi elementi. Odkrili so ga pri 40 % vrst bakterij in 90 % vrst arhej (Hsu in sod., 2014).

Lokus CRISPR sestavlja gruča s CRISPR povezanih genov (geni *Cas*) in ponavljajoča zaporedja, katera so prekinjena z variabilnimi zaporedji (vmesniki; angl. *spacers*), ki ustrezajo tujim genetskim zaporedjem (protivmesniki; angl. *protospacers*) (Lim in sod., 2016). Geni *Cas* se prevedejo v proteine, zaporedje CRISPR pa se prepíše kot ena sama RNA, ki se preko dodatnih procesov spremeni v več kratkih CRISPR RNA (crRNA). Njihova naloga je pravilno usmerjanje vezave proteinov Cas na tarčno zaporedje. Najpogostejši protein Cas, ki se uporablja za molekularno kloniranje, je Cas9. V Cas9 je zasidrana nekodirajoča tracrRNA (angl. *trans-activating crRNA*), ki se hibridizira z iskalno crRNA, da nastane RNA hibrid. Za namene raziskav sta tracrRNA in crRNA združeni v eno molekulo, imenovano vodeča RNA oziroma guide RNA (gRNA) (Mekler in sod., 2016). Endonukleazo Cas9 usmerja gRNA, ki deluje kot specifična iskalna enota. Z njo lahko enostavno, natančno in sistematično spreminjamo genom večine organizmov. Encim Cas9 se ustavi na točno določenem delu genoma, kjer pride do parjenja med vezano gRNA in genomsko DNA. Na tem mestu Cas9 prepozna zaporedje PAM (angl. *protospacer adjacent motif*), poleg katerega povzroči dvoverižni prelom DNA molekule (Hsu in sod., 2014).

Pri dvoverižnem prelomu DNA molekule nastaneta prosta konca, ki se popravita s homologno rekombinacijo (HR) ali z združevanjem nehomolognih kocev (NHEJ). Pri popravilu s HR vstavimo v tarčni organizem matrično DNA, ki vsebuje dve regiji, ki sta identični regijam na mestu preloma DNA. Poleg tega lahko med te dve mesti v matrici poljubno vstavimo željene gene, ki se ob popravilu prelomljene DNA vstavijo v genom tarčnega organizma. S spreminjanjem regij matricne DNA tako, da ustrezajo drugim regijam ob mestu preloma DNA, lahko povzročimo tudi delecije genov, ki se nahajajo na tem mestu.



Slika 1: Delovanje sistema CRISPR-Cas9 (prirejeno po Charpentier in Doudna, 2013)

3.3 PREDNOSTI IN SLABOSTI SISTEMA CRISPR-Cas9

Sistem CRISPR-Cas9 odlikuje njegova enostavnost, natančnost in hitrost, ter ekonomičnost. S pomočjo vektorjev ga vstavimo neposredno v celico, kar občutno pospeši celoten postopek spreminjanja genoma. Sistem CRISPR-Cas9 je enostavno prilagodljiv kateremu koli mestu v genomu. S spreminjanjem zaporedja gRNA nadzorujemo, kje bo Cas9 naredil dvoverižni prelom DNA ter posledično, kam bo uvedena sprememba. Pri tem nam ni potrebno spremeniti Cas9 proteina, kar dodatno olajša celoten proces. CRISPR-Cas9 nam omogoča tudi sočasno spremembo več mest v genomu. S hkratno uporabo več različnih gRNA lahko sočasno, v eni celici, izvedemo številne spremembe genoma, kar še dodatno pospeši celoten proces (Gupta in Musunuru, 2014).

Tehnologija CRISPR-Cas9 ima tudi nekaj pomanjkljivosti. Za ustrezno delovanje je potrebno vstaviti v genom tarčne celice tako gRNA kot Cas9 protein. DNA zapis proteina Cas9 je velik 4,2 kilobaznih parov (kbp), kar, zaradi velikosti, oteži vstavljanje gena za protein Cas9 v celico (Gupta in Musunuru, 2014). Potrebno je izbrati ustrezen vektor ter ga prilagoditi z dodatkom ustreznega promotorja. Poleg tega sistem CRISPR-Cas9 ne vsebuje popravljalnih mehanizmov, zato je po dvoverižnem prelomu DNA njena poprava odvisna izključno od celičnih popravljalnih mehanizmov. Največjo skrb sistema CRISPR-Cas9 predstavljajo netačne spremembe DNA, ki jih ne moremo zaznati. Pogosto se zgodi, da se gRNA pari z genomsko DNA, ki se od gRNA zaporedja razlikuje le v enem baznem paru (bp). Tako protein Cas9 prepozna neustrezno zaporedje PAM in napačno razreže DNA in sprememba je uvedena na napačno mesto v genomu (Gupta in Musunuru, 2014).

4 UPORABA TEHNOLOGIJE CRISPR-Cas9 V METABOLNEM INŽENIRINGU

4.1 BIOGORIVA

Fosilna goriva so trenutno najpomembnejši vir energije in številnih kemikalij. Posledica hitrega razvoja industrije, konstantne porabe energije in odvisnosti od fosilnih goriv, so klimatske spremembe ter onesnaženost okolja, ki predstavljajo velik svetovni problem. Želja po čisti in obnovljivi energiji, ki ne onesnažuje okolja, je spodbudila raziskave številnih, okolju prijaznih, alternativnih virov energije. Razvoj sintezne biologije ter metabolnega in genskega inženiringa je omogočil razvoj učinkovitih celičnih tovarn, ki pretvarjajo obnovljive vire energije v biogoriva. Najpogostejše alternative fosilnim gorivom so etanol, butanol ter maščobne kisline in izoprenoidi.

4.1.1 Bioetanol

Bioetanol je eden od kandidatov obnovljive in čiste energije. Dodaja se ga h fosilnim gorivom, s čimer zmanjšamo njihovo porabo in posledično onesnaževanje.

Saccharomyces cerevisiae predstavlja idealen modelni organizem za proizvodnjo bioetanola, vendar je potrebno optimizirati njegovo metabolno pot. Pod anaerobnimi pogoji *S. cerevisiae* proizvaja bioetanol z dekarboksilacijo piruvata v acetaldehid, ki se z alkohol dehidrogenazo 1 (gen *ADH1*) reducira v bioetanol. *S. cerevisiae* poleg bioetanola proizvaja tudi glicerol in acetat, ki omejujeta proizvodnjo bioetanola. Za učinkovito pretvorbo glukoze v bioetanol je potrebno preusmeriti metabolni pretok v smeri nastanka bioetanola, kar lahko storimo tako, da inaktiviramo gene, ki so potrebni za pravilno delovanje encimov, udeleženih v produkciji glicerola (glicerol-3-fosfat dehidrogenaza 1 in 2, gena *GPD1* in *GPD2*), acetata (aldehid dehidrogenaza 4 in 6, gena *ALD4* in *ALD6*) ter oksidaciji bioetanola nazaj v acetaldehid (alkohol dehidrogenaza 2, gen *ADH2*) (Liu in sod., 2019).

Liu in sodelavci so se odločili uporabiti sistem CRISPR-Cas9, saj lahko z njim v genom hitro in učinkovito sočasno vstavijo večje število sprememb. Zgradili so vektor, ki nosi gRNA kaseto, ki ustreza zapisu za gene *ADH2*, *GPD1* in *ALD4* ter gen za odpornost proti ampicilinu. Izdelali so tudi vektor s kaseto za Cas9 in matrično DNA, ki je potrebna za popravilo dvoverižnega preloma DNA s HR. Matrica vsebuje spremenjene alele *ADH2*, *GPD1* in *ALD4*. Z delecijo imajo odstranjenih 20 bp ter regijo PAM. Spremembe se nahajajo med homolognima regijama, potrebnima za ustrezno popravo dvoverižnega preloma s HR. Regija PAM je odstranjena z namenom odprave ne-tarčnih prelomov DNA, ki so posledica delovanja proteina Cas9. Tako so znanstveniki zagotovili pravilno in natančno delovanje sistema CRISPR-Cas9 (Bao in sod., 2015; Liu in sod., 2019).

V enem koraku transformacije sta bila vstavljena oba vektorja, ki nosita gRNA in protein Cas9, pa tudi matrična DNA. S tem so se izognil več zaporednim transformacijam, uporabi več selekcijskih gojišč in genov za rezistenco, kar se odraža v krajšem času poteka poskusa in nižjem strošku celotne izvedbe poskusa v primerjavi s tradicionalnimi metodami transformacije in selekcije sevov z želenimi mutacijami (Liu in sod., 2019).

Rezultat je mutirana *S. cerevisiae*, ki ima spremenjen metabolni pretok v smeri bioetanola zaradi nedelujočih genov *ADH2*, *GPD1* in *ALD4*. Mutiran sev po 69 h proizvede 36 % manj glicerola in 26 % manj acetata kot sev divjega tipa, vendar se, kljub 22,5-odstotnemu izboljššanemu izkoristku pretvorbe glukoze v bioetanol, končna produktivnost in proizvedena koncentracija bioetanola ni spremenila (15 g bioetanol/L) (Liu in sod., 2019).

4.1.2 Izoprenoidi

Izoprenoidi so raznolika skupina organskih spojin, zgrajenih iz izoprenskih enot, ki nastanejo preko mevalonatne poti. Uporabljajo se za proizvodnjo zdravil, kemikalij in biogoriv. Bisabolen je eden izmed pomembnejših izoprenoidov in je pomemben prekurzor za proizvodnjo biogoriv. Kot celična tovarna se uporablja bakterija *E. coli*, vendar bakterija ne

more proizvajati bisabolena. Razlog je v tem, da nativna *E. coli* nima mevalonatne poti. Zato je potrebno vanjo vstaviti mevalonatno pot (Alonso-Gutierrez in sod., 2017).

Ekspresijski sistemi z zapisom metabolne poti na plazmidih so nestabilni. Poleg tega je potrebno dodajati velike količine antibiotikov, da ohranijo plazmid, kar pa je za industrijo neugodno zaradi visokih stroškov. Zato želi industrija uporabljati ekspresijske sisteme, ki imajo metabolno pot integrirano v genom.

Vsi geni, ki sestavljajo mevalonatno pot, so skupaj veliki 12 kbp, zato jih je bilo, za lažjo integracijo, potrebno razdeliti na 3 module, ki so bili s pomočjo vektorjev, ki niso sposobni podvojevanja v genomu (angl. *suicide vectors*), vgrajeni na 3 različne dele genoma *E. coli* DH1. Najprej je bil vgrajen modul M (encimi za pretvorbo mevalonata v izopentenil pirofosfat (IPP)), sledi modul B (encimi za proizvodno bisabolena) in na koncu še modul T (encimi za pretvorbo acetyl-CoA v mevalonat). Tako izgrajena celična tovarna (sev DK4) ima nizke donose bisabolena (138 µg/L) na gojišču s saharozo. To je pričakovano, saj ima bakterija v primerjavi s plazmidnim ekspresijskim sistemom le en gen v genomu, odgovoren za ekspresijo ustreznega encima. Za izboljšanje produktivnosti je potrebno zamenjati že obstoječe promotorje z močnejšimi. Primeren je bakteriofagni promotor T7 RNA (P_{T7}), ki je aktiven ob prisotnosti bakteriofagne T7 RNA-polimeraze (T7RNAP). Ta ima večjo transkripcijsko kapaciteto kot nativna RNA-polimeraza, kar omogoča večjo ekspresijo genov pod nadzorom promotorja P_{T7} . T7RNAP je bila vstavljena v genom s pomočjo KIKO vektorjev (angl. *knock-in/ knock-out vectors*), P_{T7} pa je s pomočjo sistema CRISPR-Cas9 zamenjal šibkeše, že obstoječe promotorje (Alonso-Gutierrez in sod., 2017).

Alonso-Gutierrez in sodelavci so želeli natančno optimizirati mevaloantno pot, vendar je bila ta naloga težavna zaradi že integrirane metabolne poti v genom. Sistem CRISPR-Cas9 je omogočil poseganje neposredno v genom, kjer je omogočil enostavno, hitro in natančno zamenjavo šibkih promotorjev. Uporabili so binarni vektorski sistem, kjer je prvi plazmid vseboval Cas9 gene, drugi pa tarčno gRNA za določen šibak promotor. Za popravilo dvovertičnega preloma DNA je bila vstavljena matrična DNA z zapisom za močan P_{T7} .

Najbolje sta se izkazali celični tovarni *E. coli*, ki sta imeli zamenjan promotor le pred modulom T (sev DK16, 300 µg/L bisabolena) in sev z zamenjanima promotorjema pred moduloma T in B (sev DK29, 435 µg/L bisabolena). Ostali sevi so imele manjšo produktivnost kot sev DK4. Sev, ki bi imel zamenjane vse 3 nativne promotorje s P_{T7} promotorji, pa ni bil viabilen.

Možnost izboljšave se odpira z neprestanim razvojem tehnologije in orodij za manipuliranje genoma, kot sta Multiplex Automated Genome Engineering (MAGE) in CRISPR Optimized MAGE Recombineering (CRMAGE) (Alonso-Gutierrez in sod., 2017).

4.2 BIOPOLIMERI

Plastika, z lastnostmi kot so nizka gostota, prosojnost, vzdržljivost, visoka natezna trdnost in enostavno procesiranje, se danes na enostaven način proizvaja iz fosilnih goriv po nizki ceni in v zelo visokih količinah. Najpogostejši polimeri, ki sestavljajo konvencionalno plastiko, so polietilen, polipropilen, polistiren, polivinil klorid in najlon. Način proizvodnje in visoka obstojnost prispevajo k onesnaževanju okolja in kopičenju plastike v okolju. Z dvigom skrbi za okolje in iskanjem rešitev se je začel razvoj biorazgradljivih polimerov, narejenih iz obnovljivih virov biomase (Choi in sod., 2020). Potencialni kandidati za zamenjavo plastike so polihidroksialkanoati (PHA). To so naravni poliestri, katere proizvajajo številni mikroorganizmi in imajo zelo podobne lastnosti kot konvencionalna plastika. Za razliko od plastike so PHA biorazgradljivi in imunološko inertni. Z razvojem genomskega in metabolnega inženiringa so razvili številne ekspresijske sisteme, ki so sposobni proizvodnje PHA in drugih polimerov, ki naravno niso prisotni v mikroorganizmih: polietilen tereftalat (PET) in politrimetilen tereftalat (PTT).

4.2.1 Polihidroksialkanoati (PHA)

PHA so naravni alifatski poliestri, katere mikroorganizmi kopičijo v granulah in jih uporabljajo kot zalogo ogljika in energije. Njihovo proizvodnjo vzpodbudi pomanjkanje dušika ali fosforja oziroma presežek ogljika. Glavni naravni proizvajalci PHA so *Ralstonia eutropha*, *Pseudomonas oleovorans* in *Pseudomonas putida*, za rekombinantno produkcijo pa so razvili tudi seve *E. coli*.

Najbolj preučen PHA je poli(3-hidroksibutirat) (PHB), ki se danes proizvaja z rekombinantno *E. coli*, saj v njej ne poteka intracelularna depolimerizacija. Rekombinantna *E. coli* YH090 vsebuje PHA operon, prenesen iz *R. eutropha*, ki nosi gene *phaA* (encim β -ketotiolaza), *phaB* (NADPH-acetoacetyl-CoA reduktaza) in *phaC* (PHA polimerazo). To so najpomembnejši geni v sintezi PHB iz acetyl-CoA (Jung in sod., 2019; Choi in sod., 2020). Na produkcijo PHB vpliva predvsem koncentracija acetyl-CoA, NADPH (reducirajoči agent in kofaktor) in stranskih produktov, kot so laktat, format, acetat in etanol. Večjo količino PHB lahko dosežemo s prekomernim izražanjem gena *pntAB*, ki je zadolžen za pretvorbo NADH v NADPH, in s preusmeritvijo metabolnega pretoka tako, da preprečimo nastanek stranskih produktov. Za tvorbo stranskih produktov so zadolženi geni *pflb* (format), *ldhA* (laktat), *adhE* (etanol) in transkripcijski regulator *fnr*, katere je potrebno odstraniti. Preusmeritev povzroči kopičenje acetyl-CoA in ostalih prekurzorjev v celici, to pa vodi v povišano produkcijo PHB (Jung in sod., 2019).

Za povišanje proizvodnje PHB je primerna uporaba sistema CRISPR-Cas9. Z njim je odstranjena potreba po uporabi več genov za rezistenco. S tem se odstrani možnost razvoja seva, ki je odporen proti številnim antibiotikom in bi lahko predstavljal grožnjo za zdravje

ljudi, poceni pa se tudi celotna proizvodnja, saj ni več potrebe po dodajanju antibiotikov. Prednost sistema CRISPR-Cas9 je tudi njegova preprostost in učinkovitost. Zmanjša se količina celotnega dela, kar še dodatno poenostavi in pospeši celoten proces. Za pravilno delovanje sistema Crispr-Cas9 je potrebno konstruirati binarni vektorski sistem, kjer en plazmid vsebuje Cas9, drugi pa gRNA z zaporedjem, ki se ujema s tarčnimi geni *pflb*, *ldha*, *adhE*, *fnr* in *pntAB*. Matrica nosi le 1 kbp veliko homologno regijo na obeh straneh tarčnega gena, ki služi za popravilo s HR. S tem se zagotovi delecija tarčnih genov. Sledi transformacija rekombinantne *E. coli* in delecija tarčnih genov s sistemom CRISPR-Cas9 ter povečano izražanje *pntAB*. Dobimo bakterijo *E. coli* HR002, ki ima za 41 % večjo produkcijo PHB (2,1 g/L) kot sev YH090 (1,49 g/L) po 48 h. Poleg tega ima sev HR002 2,8-krat in 4-krat višjo koncentracijo acetil-CoA in 3-hidroksibutiril-CoA, kar je rezultat znižane koncentracije predvsem laktata (2,27 mM znižano na 1,05 mM) in formata (9,12 mM znižano na 2,89 mM) (Jung in sod., 2019).

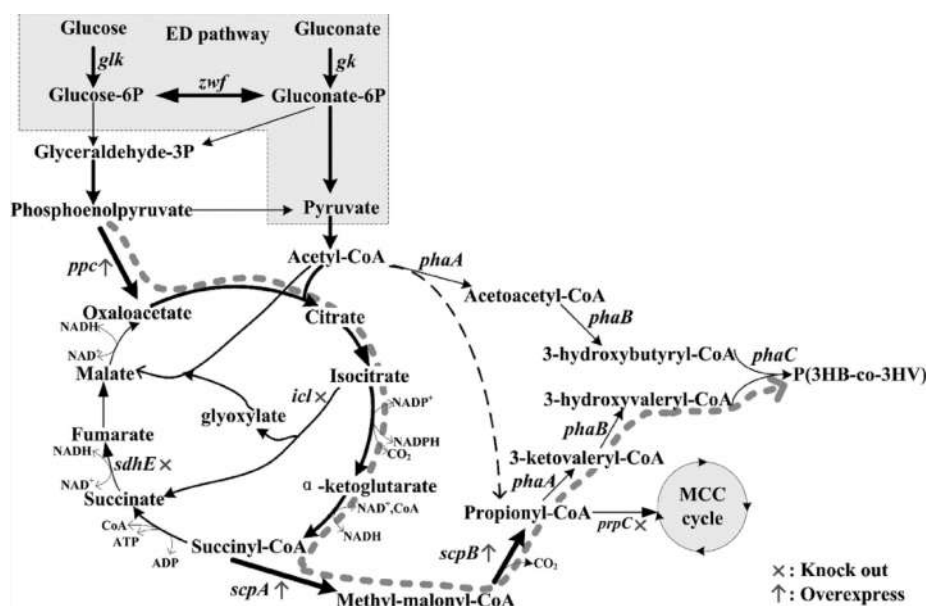
4.2.2 Poli (3-hidroksibutirat-ko-3-hidroksivalerat) (PHBV)

Ko-polimer PHBV je sestavljen iz več ponovitev monomerov 3-hidroksibutirata (PHB) ter 3-hidroksivalerata (3HV), v različnih razmerjih, in spada v skupino PHA. PHBV odlikujejo enake lastnosti kot ostale PHA, je biorazgradljiv in imunološko inerten, vendar ima v primerjavi s PHB nižjo temperaturo tališča ter nižjo stopnjo kristaliničnosti, kar mu omogoča višjo prožnost. Temperatura tališča in prožnost sta neposredno odvisna od koncentracije 3HV, ki mora biti za doseganje ustreznih lastnosti potrebnih v industriji med 10 in 25 mol%. Naravni proizvajalec PHBV je *Halomonas bluephagenesis*, ki s pomočjo operona PHA, ob visoki koncentraciji soli in visokem pH, izloča ko-polimer. Trenutna proizvodnja na industrijski ravni poteka s pomočjo rekombinantnih mikroorganizmov, ki imajo vstavljene plazmide z zapisom metabolne poti PHBV. Takšna proizvodnja ima visoke donose, vendar ima tudi nekatere pomanjkljivosti. Plazmidi so nestabilni, poleg tega pa je potrebna uporaba antibiotikov za njihovo vzdrževanje, kar podraži proizvodnjo PHBV (Chen Y. in sod., 2019). Da bi pocenili proizvodnjo, potekajo raziskave v smeri integracije metabolne poti v kromosom in nadaljnega izboljšanja z metabolnim inženiringom ter uporabo poceni virov ogljika, kot so glukoza ali natrijev glukonat iz organskih odpadkov. Idealno orodje za integracijo metabolne poti direktno v genom je sistem CRISPR-Cas9.

Proizvodnja PHBV, v rekombinantnem *H. bluephagenesis*, se poveča s preusmeritvijo metabolnega pretoka. S tem se izklopijo metabolne poti, ki porabljajo intermediate za nastanek neželenih molekul. Glavni intermediat je sukcinil-CoA, ki nastaja v ciklu citronske kisline (CCK), čigar koncentracija se poveča z delecijo genov *sdhE* in *icl*. Trenutno je rekombinazni sistem λ -Red eden izmed bolj uveljavljenih sistemov za spreminjanje genoma, vendar so se Chen Y. in sodelavci odločili uporabiti sistem CRISPR-Cas9 za delecijo tarčnih genov. Sistem λ -Red temelji na delovanju dveh encimov (eksonukleaza λ in Red β), ki se vežeta na DNA. λ eksonukleaza počasi razgradi DNA, Red β pa zagotovi poravnavo

razgrajenega dela DNA z matrično DNA, ki je potrebna za vnos željene spremembe s HR (Caldwell in Bell, 2019). CRISPR-Cas9 ima nekatere prednosti v primerjavi z rekombinaznim sistemom λ -Red: pri uporabi CRISPR-Cas9 je potrebno v genom dodati DNA zaporedje le za en protein (Cas9), pri sistemu λ -Red pa za dva. Poleg tega celoten postopek traja manj časa kot pri sistemu λ -Red, kjer eksonukleaza λ potrebuje več časa za razgradnjo tarčnega dela DNA. Oba sistema za popravilo DNA uporabljata HR, zato je pri obeh potrebno v tarčni organizem vnesti matrico, ki nosi zapis za popravilo DNA. Uporaba sistema λ -Red je zamudnejša ter zahteva več laboratorijskega dela za izdelavo več plazmidov (Caldwell in Bell, 2019). Uporaba sistema CRISPR-Cas9 bistveno pospeši postopek delecije genov *sdhE* in *icl*, saj lahko obe deleciji izvedemo istočasno, odstrani pa se tudi potreba po uporabi večih markerskih genov.

Na enak način kot je povzročena delecija genov *sdhE* in *icl*, se vstavi tudi operon *scpAB* (zapis za gena *scpA* in *scpB*), ki spremeni sintezno pot PHVB (slika 2). Potrebna je še delecija genov *prpC*, in *phaZ*. S tem korakom nastaja in se zadržuje propionil-CoA, ki predstavlja enega izmed pomembnejših intermediatov PHBV. Dobimo celično tovarno, ki uspešno porablja glukozo za produkcijo PHBV. Pri tem postopku je vsebnost 3HV prenizka za industrijsko uporabo (le od 2 do 5 mol%), zato so potrebne dodatne izboljšave. Produkcija 3HV v PHBV se izboljša z uporabo natrijevega glukonata kot vira ogljika in z dodatkom gena *ppc*, ki poveča razpoložljivost piruvata. Na koncu dodajo še gen *vgb* za bakterijski hemoglobin (iz bakterij rodu *Vitreoscilla*), ki izboljša donos kisika v CCK in posledično poveča metabolni pretok v smeri intermediatov CCK in PHBV. S tehnologijo CRISPR-Cas9 modificirana celična tovarna *H. bluephagenesis* proizvede 7 g suhe celične mase/L, ki vsebuje 75 % PHBV z 18 mol% 3HV (Chen Y. in sod., 2019). Tako pridobljen PHBV ko-polimer ima primerne lastnosti za uporabo v industriji in medicini.



Slika 2: Metabolna pot PHBV (Chen Y. in sod., 2019)

4.3 MIKROBNA BARVILA

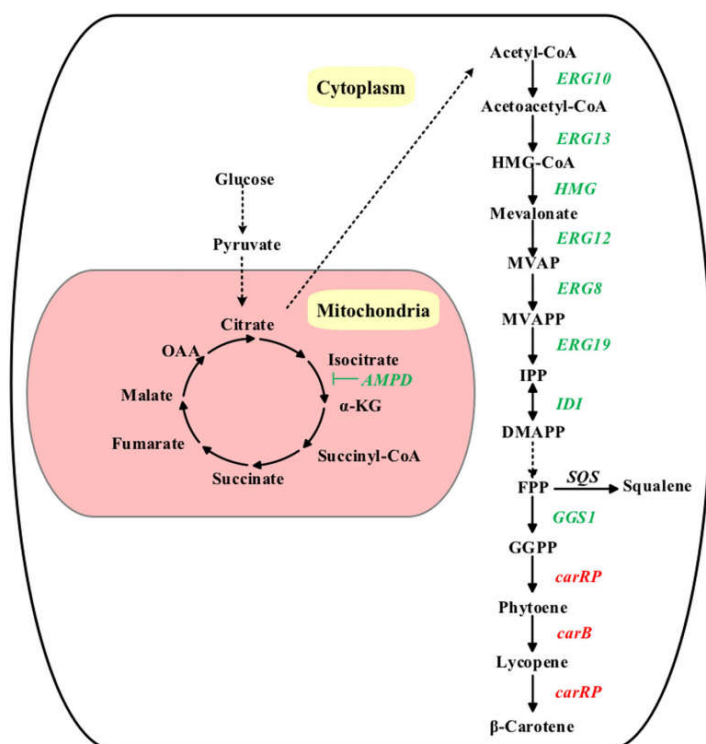
Mikroorganizmi proizvajajo barvila (pigmente), da se zaščitijo pred številnimi fizikalnimi dejavniki. Pigmenti ščitijo mikroorganizme predvsem pred UV sevanjem, nevarnimi kisikovimi radikali ter težkimi kovinami in tako povečajo njihove preživetvene sposobnosti. Mikrobnii pigmenti se vse več raziskujejo zaradi visokih barvnih sposobnosti ter antioksidativnega delovanja in posledično široke možnosti uporabe v živilski, tekstilni in kozmetični industriji, v proizvodnji farmacevtikov ter plastike. Glavni proizvajalci mikrobnih barvil so mikroalge (*Dunaliella salina*, *Hematococcus pluvialis*), nitaste glive (*Blakeslea trispora*) in kvasovke (*Xanthophyllomyces dendrorhous*, *Yarrowia lipolytica*), ki proizvajajo predvsem karotenoide (astaksantin, β -karoten). Večji skupini mikrobnih barvil predstavljajo tudi monascus barvila in fikobiliproteini.

4.3.1 β -karoten

β -karoten je eden izmed najbolj poznanih predstavnikov karotenoidov, katere po zgradbi uvrščamo med izoprenoide. Odlikujejo ga visoka antioksidativna aktivnost, visoke barvne sposobnosti ter možnost uravnavanja imunskega odziva (Zhang in sod., 2020). Tradicionalno se β -karoten in ostali karotenoidi pridobivajo z ekstrakcijo iz rastlinskih virov, kjer so njihove koncentracije nizke. Posledično je potreben velik vložek energije in denarja, zato je postopek neekonomičen. Danes se karotenoide proizvaja s kemično sintezo, vse več pa se uveljavlja produkcija z mikroorganizmi. Z namenom pridelave β -karotena so razvili celično tovarno *Y. lipolytica*, ki ima naravno prisotno mevalonatno biosintezno pot. Ta je nujno potrebna za sintezo prekursorjev β -karotena.

Y. lipolytica lahko preko mevalonatne poti izgradi izopentenil pirofosfat (IPP) ter geranilgeranil pirofosfat (GGPP) (slika 3), vendar slednjega naravno ne more pretvoriti v β -karoten. Zato moramo v *Y. lipolytica* vstaviti heterologne gene za proizvodnjo β -karotena (*carB* (fitoen dehidrogenaza) in *carRP* (fitoen sintaza/likopen ciklaza)). Za oba heterologna gena so izdelali plazmid z ustrezno gRNA, integracija genov v genom pa je, po transformaciji celične tovarne, potekla s sistemom CRISPR-Cas9. Tako so Zhang in sodelavci v genom vgradili ustrezne gene, s čimer so odpravili nestabilnost sevov *Y. lipolytica*, kar je potrebno za proizvodnjo na industrijskem nivoju. Z integracijo genov v genom so tudi močno zmanjšali uporabo antibiotikov, ki so potrebni, če se gene izrazi in vzdržuje v genomu na plazmidih. Tako pridobljen sev je proizvedel 17,1 mg karotena/L. Za izboljšanje produkcije β -karotena so znanstveniki v genom *Y. lipolytica* vstavili še 2 kopiji gena *carRP* in eno kopija gena *carB*. Zamenjali so tudi nativni promotor s promotorjem UAS1B8-TEF(136) ter prekomerno izrazili gene *GGS1* (GGPP sintaza), *HMG* (3-hidroksi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA)) reduktaza in *ERG13* (HMG-CoA sintaza), ki so zadolženi za proizvodnjo IPP, GGPP in HMG-CoA (slika 3). Posledično se poveča koncentracija intermediatov IPP, GGPP in HMG-CoA kar se odraža v povišani koncentraciji β -karotena (168 mg/L). Za visoko proizvodnjo β -

karotena je potrebna tudi visoka celična gostota, katere pa zaradi avksotrofности za uravil in levcin seva *Y. lipolytica* ni bilo možno doseči. Za odpravo tega problema so v genom vstavili gena *URA3* in *LEU2*, ki sta odpravila potrebo po dodajanju uracila in leucina, s tem pa se poveča tudi proizvedena koncentracija β -karotena (407 mg/L). Tako optimizirana celična tovarna je, v 5 L bioreaktorju in s stalnim optimalnim dohranjevanjem glukoze, sposobna proizvesti 4.5 g/L β -karotena v 165 h bioprocasa (Zhang in sod., 2020).



Slika 3: Biosintezna pot β -karotena (Zhang in sod., 2020)

4.4 AROME

Arome so skupek olfaktornih in degustatornih zaznav, ki imajo pomembno vlogo v živilski, kozmetični in farmacevtski industriji, saj oblikujejo senzorične lastnosti končnega produkta. Naravni producenti arom so rastline (eterična olja), živali (muskon) in mikroorganizmi (na primer maslena, jabolčna in druge sadne arome). Zaradi nizkih koncentracij aromatičnih spojin ter težavne in drage izolacije arom iz rastlinskih in živalskih virov, razvijajo celične tovarne, ki so sposobne proizvodnje visokih koncentracij, poleg tega pa so okolju bolj prijazne kot proizvodnja s kemično sintezo. Končni cilj je *de novo* sinteza aromatičnih spojin s celičnimi tovarnami, kjer se kot vir ogljika porabljajo odpadki (melasa, lignocelulozna biomasa).

4.4.1 Aroma hmelja

Tekom varjenja piva *S. cerevisiae* pretvori sladkorje iz zrn ječmena v etanol in druge snovi, ki določajo končen okus piva. Temu koraku se reče drozganje. Po drozganju sledi kuhanje sladice in dodatek hmelja, ki daje pivu značilen okus. Hmelj je najpomembnejša sestavina, poleg ječmenovega sladku, ki določa senzorične lastnosti piva. Proizvodnja hmelja je draga, saj je potrebna ustrezna infrastruktura ter obilno zalivanje. Poleg tega sestava hmelja med sezonami variira, kar se odraža v spremenjenem okusu piva. Za rešitev problema variiranja okusa med sezonami in pocenitve proizvodnje piva, so razvili celične tovarne, ki proizvajajo enake aromatične spojine kot se nahajajo v hmelju. Glavni aromatični spojini, ki dajeta okus po hmelju, sta monoterpena linalol in geraniol (Denby in sod., 2018), ki nastaneta iz intermediatov mevalonatne poti.

S. cerevisiae ni sposobna proizvodnje linalola in geraniola, zato je potrebno v njen genom vstaviti linalol sintazo (McLIS) in geraniol sintazo (ObGES). Sintazi sta bili pridobljeni iz mete (McLSI) in bazilike (ObGES), saj je genom hmelja slabo poznan. Za večjo produkcijo je potrebno istočasno tudi izboljšati metabolni pretok intermediatov mevalonatne poti. Da bi povečali koncentracije intermediatov, sta bili modificirani HMG-CoA-reduktaza (tHMGR) in fernesilpirofosfat sintaza (FPPS). Imeli sta odstranjeno regulatorno domeno. tHMGR in FPPS povečata dotok mevalonata in fernesil pirofosfata (FPP), kar se odraža v povečani koncentraciji geranil pirofosfata (GPP), ki je glavni prekursor linalola in geraniola. Vsi štirje geni so bili vstavljeni v genom s pomočjo sistema CRISPR-Cas9 in s primerno izgrajeno tarčno gRNA. Ta je privedla Cas9 protein na ustrezno mesto v genomu, kjer je ta povzročil dvoverižni prelom DNA. Potrebno je bilo izgraditi tudi matrično DNA, ki je vsebovala McLIS, ObGES, tHMGR in FPPS. Matrična DNA se uporabi za popravilo dvojnega preloma DNA s HR.

Denby in sodelavci so se odločili za uporabo sistema CRISPR-Cas9 zaradi možnosti integracije genov brez uporabe selekcijskih markerjev (geni za rezistenco), saj bi se končno optimizirani sevi *S. cerevisiae* uporabljali v živilski industriji. Zaradi uporabe genov za rezistenco obstaja možnost razvoja odpornih sevov mikroorganizmov, ki predstavljajo potencialno tveganje in nevarnost tako za industrijo kot za končnega uporabnika. Zaradi tega razloga je priporočen izogib uporabe genov za rezistenco kot selekcijskih markerjev. Tehnologija CRISPR-Cas9 omogoči tudi hitro, učinkovito in nemoteno integracijo večjih genov oziroma skupka genov v genom tarčnega organizma.

Tako izdelana rekombinantna *S. cerevisiae* se lahko uporabi pri varjenju piva, brez potrebe po dodatku hmelja. Mikroorganizem je zaradi integracije ustreznih genov v genom stabilnejši in je sposoben proizvodnje velikih količin linalola in geraniola, ki se dodajata, namesto hmelja, v proces varjenja piva. S tem se celoten proces varjenja piva poceni, obenem pa je okus piva med sezonami konstanten. Senzorične lastnosti piva in koncentracija (~0,2 mg/L) linalola in

geraniola, proizvedenega z rekombinantno *S. cerevisiae*, so primerljive s pivom, proizvedenim s tradicionalnimi postopki (Denby in sod., 2018).

4.4.2 Valencen

Valencen je aromatična spojina, zgrajena iz treh izoprenskih enot, ki se naravno nahaja v številnih vrstah citrusov. Zaradi okusa in vonja po citrusih se najpogosteje uporablja v živilski industriji, kot dodatek h hrani in pijači, ter v kozmetični industriji, kot sestavni del krem in parfumov. Valencen se lahko z oksidacijo pretvori tudi v nootkaton, ki deluje kot inhibitor proliferacije rakotvornih celic. Ekstrakcija valencena iz citrusov na industrijskem nivoju ni ekonomična, saj je koncentracija v citrusih nizka. Zato so razvili celično tovarno, ki lahko proizvede višje koncentracije valencena.

Kot osnova za celično tovarno je bil izbran za uracil avksotrofni sev *S. cerevisiae*, v katerega so bile z sistemom CRISPR-Cas9 uvedene ustrezne spremembe. Glavni prekursor valencena je FPP, zato je potrebno z metabolnim inženiringom povečati njegovo koncentracijo tako, da zmanjšamo njegovo porabo za proizvodnjo nezaželenih produktov (skvalen in GGPP). Za povečanje koncentracije FPP je potrebno uvesti naslednje spremembe: delecija gena *BTS1*, ki zapisuje GGPP sintazo, delecija *ROX1* transkripcijskega faktorja, represija skvalen sintaze (gen *ERG9*), s skrajšanjem njenega promotorja, ter delecija lokusov *ypl062* in *ypl064*, saj negativno vplivata na sintezo terpenov.

Uporaba sistema CRISPR-Cas9, za izdelavo večih zaporednih genetskih sprememb, ima nekaj pomanjkljivosti. Oviro predstavlja predvsem omejeno število selekcijskih markerjev za oznako posameznih gRNA ekspresijskih plazmidov. Za rešitev tega problema je bil oblikovan reciklirajoči sistem CRISPR-Cas9, ki temelji na delovanju sistema Cre/loxP, pod nadzorom z galaktozo inducibilnega promotorja prGAL1. Chen H. in sodelavci so kot osnovo za izdelavo ekspresijskega vektorja uporabili plazmid P426-CL, v katerega so kot selekcijski marker vnesli gen *URA3*, ki odpravi uracilno avksotrofnost *S. cerevisiae*. Naknadno so v ekspresijski vektor vnesli gen za rekombinazo Cre, pod nadzorom promotorja prGAL1, in dve zaporedni ponovitvi loxP, ki objemata mesto replikacije 2μ . Sledil je vnos ustrezne gRNA, ki privede protein Cas9 do gena *BTS1*. Skupaj z matično DNA, ki je imela delecijo gena *BTS1*, je bil ekspresijski vektor transformiran v tarčni organizem, ki je že vseboval protein Cas9. gRNA privede protein Cas9 na ustrezno mesto v genomu, kjer ta povzroči dvoverižni prelom DNA, ki se popravi z HR na osnovi vnesene matrice. Uspešne transformante so sposobne rasti na gojišču brez uracila in se tako ločijo od neuspešnih, ki na takem gojišču ne morejo rasti. Sledi prenos uspešnih transformant na gojišče z galaktozo, ki aktivira prepis rekombinaze Cre. rekombinaza Cre izreže mesto replikacije 2μ , ki se nahaja med dvema loxP ostankoma. Z izgubo mesta replikacije 2μ ekspresijski vektor ni več zmožen replikacije v genomu in se v njem izgubi. Tako se povrne avksotrofnost za uracil. Zaradi izgube ekspresijskega plazmida, se lahko ta lastnost ponovno uporabi za selekcijo v novem ciklu genskega inženiringa. V

nadaljnjih ciklih so bile z reciklirajočim sistemom CRISPR-Cas9 izvedene še delecije *rox1*, *ypl062* in *ypl064* ter represija gena *ERG1* (Chen H. in sod., 2019).

Nastala rekombinantna *S. cerevisiae* še ni sposobna proizvodnje valencena, zato je bila v njen genom z zadnjim ciklom reciklirajočega sistema CRISPR-Cas9 vstavljena valencen sintaza iz *Callitropsis nootkatensis* (gen *CnVS*). Tako izdelan sev *S. cerevisiae* ima še vedno prenizko produkcijo valencena, zato so bili v njegov genom, po zgoraj opisanem sistemu, vstavljene dodatne kopije genov v sintezni poti FPP. Končno optimizirana celična tovarna *S. cerevisiae* je sposobna v bioreaktorju z dohranjevanjem, v 135 h proizvesti valencen v koncentraciji 539 mg/L (Chen H. in sod., 2019).

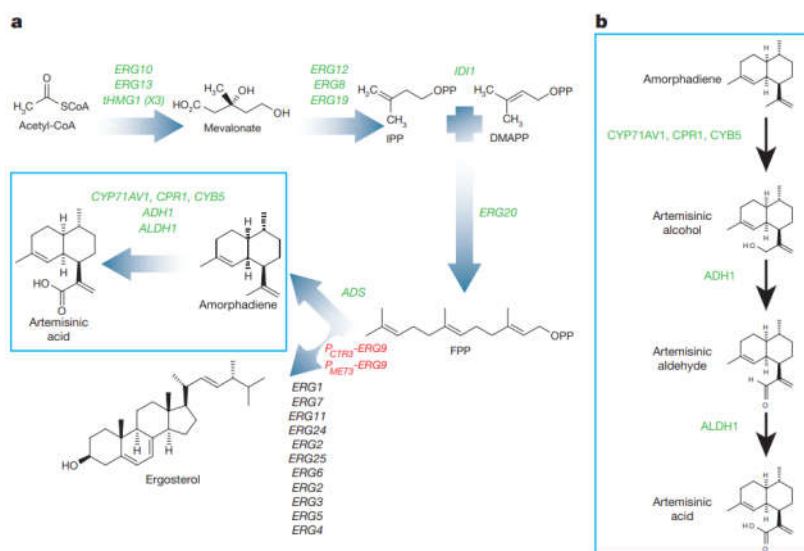
4.5 TERAPEVTSKE MOLEKULE

Terapevtske molekule se uporabljajo za zdravljenje najrazličnejših bolezni. Aktivne snovi so bile na začetku izolirane iz rastlin, živali in mikroorganizmov, vendar je imela njihova uporaba nekaj zadržkov. Izolirane substance predstavljajo tveganje za prenos bolezni med vrstami, so imunogene, njihova koncentracija, predvsem v živalih, pa je majhna. Tekom razvoja tehnologije je bila odkrita tehnologija rekombinantne DNA, ki je med drugim omogočila proizvodnjo rekombinantnih proteinov s celičnimi tovarnami na industrijskem nivoju. Kot najpogostejši ekspresijski sistem se uporabljajo celice CHO (celična linija pridobljena iz ovarijev kitajskega hrčka), ki so najbolj primerne za proizvodnjo humanih rekombinantnih proteinov, saj imajo ustrezne posttranslacijske modifikacije. Pogosto se uporabljajo tudi kvasovke (*S. cerevisiae*, *Pichia pastoris*) in bakterije (*E. coli*, *Bacillus spp.*).

4.5.1 Artemisinin

Malaria je pogosta nalezljiva tropska bolezen, ki se prenaša preko komarjev. Razširjena je v več kot 100 državah, kjer za njenimi simptomi trpi več kot 220 milijonov ljudi. Zaradi malarije je v letu 2018 umrlo 405 tisoč ljudi (WHO, 2020). Artemisinin je seskviterpen lakton, izoliran iz rastline *Artemisia annua*, in učinkovito zdravi malarijo. Količina artemisinina, izoliranega iz rastlin, je nizka in ne zadostuje svetovnim potrebam. Zato so leta 2006 razvili sev *S. cerevisiae*, ki je sposoben proizvodnje večje količine prekursorja artemisinina, artemisinske kisline, ki se v nadaljnjem koraku s kemično sintezo pretvori v artemisinin (Ro in sod., 2006). V *S. cerevisiae* sta bila preko plazmidnih vektorjev vstavljena gena za amorfadien sintaza (ADS) in citokrom P450 monooksigenazo (CYP71AV1), ki sta potrebna za sintezo artemisinske kisline (slika 4). Istočasno so bili prekomerno izraženi geni mevalonatne poti, izražanje gena *ERG9* pa je bilo znižano (slika 4) (Ro in sod., 2006). Sinteza artemisinske kisline še vedno ne pokrije svetovnih potreb po artemisininu, zato so potrebne dodatne izboljšave. Tekom raziskav metabolizma artemisinina so bili odkriti geni *CPR1* (reduktaza povezana s CYP71AV1), *CYB5* (citokrom b₅), *ADH1* (alkohol dehidrogenaza) in *ALDH1* (aldehid dehidrogenaza), ki izboljšajo pretvorbo amorfa-4,11-diena v artemisinsko

kislino (slika 4). Geni so bili vstavljeni v rekombinantno *S. cerevisiae*, ki je bila izdelana leta 2006, in izraženi v plazmidih z veliko kopijami. Njihovo regulacijo je kontroliral močan, inducibilen promotor prGAL7, ki se izraža ob prisotnosti galaktoze. Tako izdelana celična tovarna je sposobna proizvesti ~10 g/L artemisinske kisline (Paddon in sod., 2013; Ai in sod., 2019), vendar je za proizvodnjo nujno potreben dodatek galaktoze.



Slika 4: Metabolna pot artemisinske kisline (Paddon in sod., 2013)

Na promotor prGAL7 se ob prisotnosti galaktoze veže transkripcijski aktivator Gal4, ki sproži prepis genov, ki so v odsotnosti galaktoze, zaradi vezave proteina Gal80, ne izražajo. Protein Gal80 je zapisan na genu *GAL80* in deluje kot inhibitor promotorja prGAL7. Strošek dodajanja galaktoze predstavlja 20 % celotne cene proizvodnje. Za pocenitev postopka je potrebno odstraniti potrebo po galaktozi, kar povzroči delecija gena *GAL80*. Za delecijo tega gena je bil zgrajen eno-plazmidni sistem CRISPR-Cas9, kjer sta na enem plazmidu zapisa tko za Cas9 koza za gRNA. Tak sistem se pogosteje uporablja kot sistem, kjer sta Cas9 in gRNA na ločenih plazmidih. Glavna prednost eno-plazmidnega sistema CRISPR-Cas9 je hitrejša izdelava in transformacija tarčnega organizma. Razlog je v tem, da je potrebno manj dela za izdelavo le enega plazmida, ki nosi vse potrebne informacije. Za popravilo dvovertičnega preloma DNA mora biti vstavljena tudi matrična DNA, ki je zgrajena na podlagi 1099 bp dolgega zaporedja za genom *GAL80*. Končno optimizirana celična tovarna *S. cerevisiae* ne potrebuje galaktoze zaradi delecije gena *GAL80*, pri čemer se ohrani končno proizvedena koncentracija artemisinske kisline (~10 g/L) (Ai in sod., 2019).

5 ZAKLJUČEK

Razvoj učinkovitih celičnih tovarn za proizvodnjo biogoriv, kemikalij, prehranskih dodatkov in farmacevtikov je dolg, težaven in drag proces, pri katerem je potrebno veliko testiranj in optimizacij metabolnih poti za doseganje čim višjih titrov tarčnega metabolita. Z razvojem

tehnologije in z boljšim poznavanjem metabolizma ter znotraj celičnih interakcij, se možnosti in načini manipulacije genoma in metabolizma povečujejo. Eden izmed nedavno odkritih mehanizmov manipulacije genoma je sistem CRISPR-Cas9. CRISPR-Cas9 učinkovito spremeni genom, odlikuje ga visoka natančnost uvedbe sprememb, njegova enostavnost, hitrost, učinkovitost in nizka cena. Vstavimo ga neposredno v celico, gRNA privede protein Cas9 na tarčno mesto, kjer ta povzroči dvoverižni prelom DNA. Popravljalni mehanizmi popravijo dvojno vijačnico DNA z HR, na podlagi matrične DNA, pri tem pa pride do spremembe DNA zaporedja.

Eno izmed vodilnih področij metabolnega inženiringa je proizvodnja biogoriv. S CRISPR-Cas9 optimiziranimi celičnimi tovarnami se učinkovito proizvajajo biogoriva, s katerimi zmanjšamo količino porabljenih fosilnih goriv in s tem onesnaženje. Najpogostejši viri biogoriv so bioetanol ter izoprenoidi.

Fosilna goriva so tudi vir za proizvodnjo plastike, ki predstavlja enega glavnih onesnaževalcev okolja. Številni mikroorganizmi so bili spremenjeni tako, da proizvajajo različne biopolimere. Med pomembnejšimi je PHA, ki že uspešno zamenjujejo tradicionalno plastiko. Imajo podobne lastnosti kot konvencionalna plastika, vendar so biorazgradljivi in imunološko inertni.

Z uporabo sistema CRISPR-Cas9 so bili optimizirani številni ekspresijski sistemi za proizvodnjo arom in mikrobnih barvil. Arome in mikrobnna barvila igrajo pomembno vlogo v živilski industriji, kjer se dodajajo kot prehranski dodatki, pa tudi v kozmetični industriji, kot sestavina krem in parfumov. Sistem CRISPR-Cas9 je uporaben tudi za optimizacijo metabolnih poti, udeleženih v proizvodnji terapevtskih molekul, ki se uporabljajo za zdravljenje številnih bolezni. S preusmeritvijo metabolnih pretokov in integracijo metabolnih poti, so bile razvite celične tovarne, ki so sposobne proizvodnje visokih koncentracij terapevtskih molekul oziroma njihovih intermediatov.

Tehnologija CRISPR-Cas9 je povzročila revolucijo v znanstvenih pristopih in raziskavah na področju metabolnega inženiringa, s katerim so bile izdelane številne učinkovite celične tovarne, za proizvodnjo številnih, industrijsko pomembnih, snovi.

6 VIRI

- Ai L., Guo W., Chen W., Teng Y., Bai L. 2019. The gal80 deletion by CRISPR-Cas9 in engineered *Saccharomyces cerevisiae* produces artemisinic acid without galactose induction. *Current Microbiology*, 76: 1313-1319
- Alonso-Gutierrez, J., Koma D., Hu Q., Yang, Y., Chan L. J., Petzold C. J., Adams P. D., Vickers C. E., Nielsen L. K., Keasling J. D., Lee T. S. 2017. Toward industrial production of isoprenoids in *Escherichia coli*: Lessons learned from CRISPR-Cas9 based optimization

- of a chromosomally integrated mevalonate pathway. *Biotechnology and Bioengineering*, 115: 1000-1013
- Bao Z., Liang J., Zhang L., Xiong X., Sun N., Si, T., Zhao H. 2015. Homology-integrated CRISPR–Cas (HI-CRISPR) system for one-step multigene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *ACS Synthetic Biology*, 4: 585-594
- Caldwell B. J., Bell C. E. 2019. Structure and mechanism of the red recombination system of bacteriophage λ . *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 147: 33-46
- Charpentier E., Doudna J. A. 2013. Rewriting a genome. *Nature*, 495: 50-51
- Chen H., Zhu C., Zhu M., Xiong J., Ma H., Zhuo M., Li S. 2019. High production of valencene in *Saccharomyces cerevisiae* through metabolic engineering. *Microbial Cell Factories*, 18, 195: 1-14
- Chen Y., Chen X.-Y., Du H.-T., Zhang X., Ma Y.-M., Chen J.-C., Ye J.-W., Jiang X.-R., Chen G.-Q. 2019. Chromosome engineering of the TCA cycle in *Halomonas bluephagenesis* for production of copolymers of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate (PHBV). *Metabolic Engineering*, 54: 69-82
- Choi S. Y., Rhie M. N., Kim H. T., Joo J. C., Cho I. J., Son J., Jo S. Y., Sohn J. Y., Baritugo K.-A., Pyo J., Lee Y., Lee S. Y., Park S. J. 2020. Metabolic engineering for the synthesis of polyesters: A 100-year journey from polyhydroxyalkanoates to non-natural microbial polyesters. *Metabolic Engineering*, 58: 47-81
- Denby C. M., Li R. A., Vu V. T., Costello Z., Lin W., Chan L. G., Williams J., Donaldson B., Bamforth C. W., Petzold C. J., Scheller H. V., Garcia Martin H., Keasling J. D. 2018. Industrial brewing yeast engineered for the production of primary flavor determinants in hopped beer. *Nature communications*, 9, 965: 1-10
- Gupta R. M., Musunuru K. 2014. Expanding the genetic editing tool kit: ZFNs, TALENs, and CRISPR-Cas9. *The Journal of Clinical Investigation*, 124, 10: 4154-4161
- Hsu P. D., Lander E. S., Zhang F. 2014. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, 157: 1262-1278
- Jung H.-R., Yang S.-Y., Moon Y.-M., Choi T.-R., Song H.-S., Bhatia S. K., Gurav R., Kim E.-J., Kim B.-G., Yang Y.-H. 2019. Construction of efficient platform *Escherichia coli* strains for polyhydroxyalkanoate production by engineering branched pathway. *Polymers*, 11, 509: 1-14
- Lian J., Hamedirad M., Zhao H. 2018. Advancing metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* using the CRISPR/Cas system. *Biotechnology Journal*, 13: 1-11
- Lim Y., Bak S. Y., Sung K., Jeong E., Lee S. H., Kim J.-S., Bae S., Kim S. K. 2016. Structural roles of guide RNAs in the nuclease activity of Cas9 endonuclease. *Nature Communications*, 7, 13350: 1-8
- Liu K., Yuan X., Liang L., Fang J., Chen Y., He W., Xue T. 2019. Using CRISPR/Cas9 for multiplex genome engineering to optimize the ethanol metabolic pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical Engineering Journal*, 145: 120-126

- Mekler V., Minakhin L., Semenova E., Kuznedelov K., Severinov K. 2016. Kinetics of the CRISPR-Cas9 effector complex assembly and the role of 3'-terminal segment of guide RNA. *Nucleic Acids Research*, 44, 6: 2837-2845
- Mojica F. J., Diez-Villasenor C., Garcia-Martinez J., Soria E. 2005. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of Molecular Evolution*, 60: 174-182
- Mojica F., Diez-Villasenor C., Soria E., Juez G. 2000. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of archaea, bacteria and mitochondria. *Molecular Microbiology*, 36, 1: 244-246
- Nielsen J., Keasling J. D. 2016. Engineering cellular metabolism. *Cell*, 164: 1185-1197
- Paddon C., Westfall P., Pitera D., Benjamin K., Fisher K., McPhee D., Leavell M. D., Tai A., Main A., Eng D., Polichuk D. R., Teoh K. H., Reed D. W., Treynor T., Lenihan J., Fleck M., Bajad S., Dang G., Dengrove D., Diola D., Dorin G., Ellens K. W., Fickers S., Galazzo J., Gaucher S. P., Geistinger T., Henry R., Hepp M., Horning T., Iqbal T., Jiang H., Kizer L., Lieu B., Melis D., Moss N., Regentin R., Secret S., Tsuruta H., Vazquez R., Westblade L F., Xu L., Yu M., Zhang Y., Zhao L., Lievens J., Covello P. S., Keasling J. D., Reiling K. K., Renninger N. S., Newman J. 2013. High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin. *Nature*, 496: 528-536
- Ro D.-K., Paradise E. M., Ouellet M., Fisher K. J., Newman K. L., Ndungu J. M., Ho K. A., Eachus R. A., Ham T. S., Kirby J., Chang M. C. Y., Withers S. T., Shiba Y., Sarpong R., Keasling J. D. 2006. Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast. *Nature*, 440: 940-943
- WHO, World Health Organisation. 2020. Malaria.
<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/malaria> (17. julij 2020)
- Yang D., Park S. Y., Park Y. S., Eun H., Lee S. Y. 2020. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for natural product biosynthesis. *Cell Press*, 38, 7: 745-765
- Zhang X.-K., Wang D.-N., Chen J., Liu Z.-J., Wei L.-J., Hua Q. 2020. Metabolic engineering of β -carotene biosynthesis in *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnology Letters*, 42: 945-956

ZAHVALA

Zahvalil bi se mentorju prof. dr. Urošu Petroviču za prevzem mentorstva, pomoč ter hiter in temeljit pregled diplomske naloge.

Zahvaljujem se svoji družini za podporo, motivacijo in vzpodbudne besede. Cenim, da mi vedno stojite ob strani in verjamete vame. Hvala za vso pomoč in nasvete.

Hvala tudi vsem prijateljem za vzpodbudo in motivacijo.