

Jamur hitam yang berada di Batuan

# CRISPR-Cas9 dalam Sebuah Penelitian

JULIA SCHUMACHER

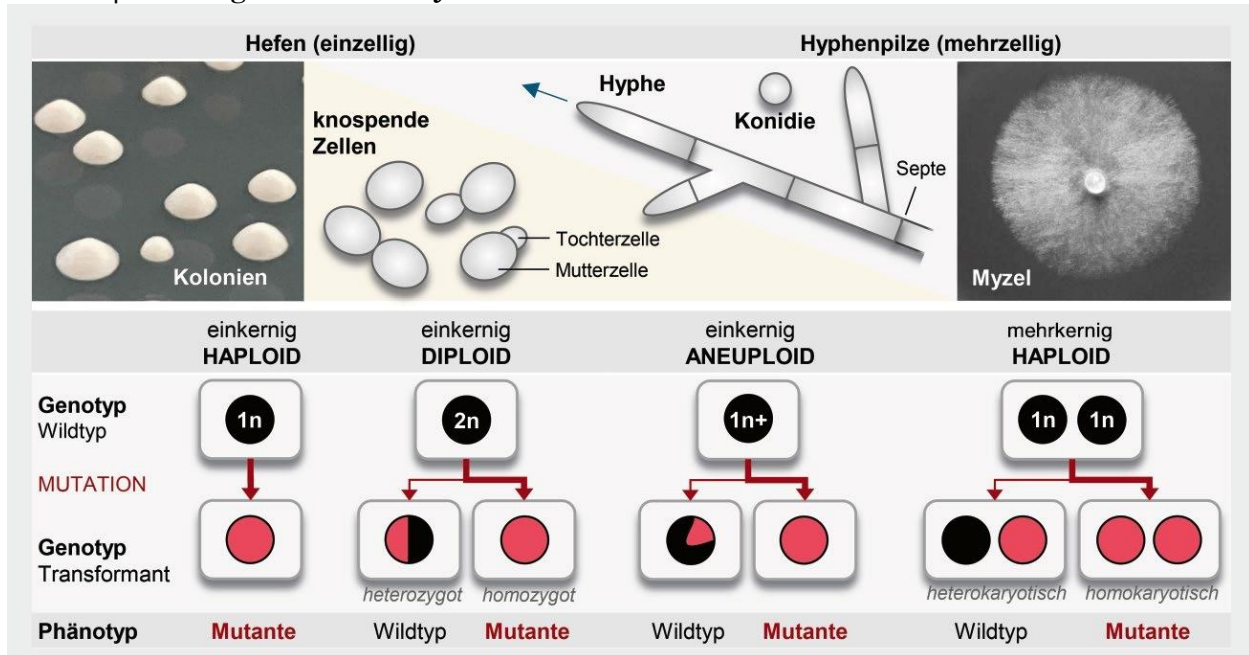


*Kehidupan mikroskopis yang berada di permukaan terbuka bersifat sederhana dan dapat bersinergi antar mikroorganisme. Jamur hitam, ganggang hijau, dan cyanobacteria saling bekerja sama dalam pelapukan batuan, dinding, monumen, atap rumah, fasad rumah, dan panel surya. Jamur hitam memiliki peran dalam pelapukan batu dan pembentukan biofilm. Jamur hitam memiliki dinding sel yang besar dan pertumbuhan yang lambat sehingga membuat jamur hitam toleran terhadap stres dan dapat dijadikan sebagai bahan penelitian eksperimental. Dalam mar, biofilm bisa jadi diinginkan atau tidak diinginkan. Biofilm pada fasad rumah memberikan dampak positif pada iklim kota, sementara itu biofilm tidak disukai jika berada di monumen marmer. Tanpa adanya pemahaman terkait adaptasi dari mikroba, maka perlu dilakukan penelitian. Maka dari itu di sinilah genetika dan bahan penelitian disatukan dalam Teknologi CRISPR-Cas9 yang melakukan penyuntingan genom jamur dalam analisis praktis, sehingga mudah dalam menguraikan koloni dan mengurangi dari kerusakan bahan.*

Jamur menampilkan keanekaragaman yang menakjubkan, mulai dari bentuk, ukurannya, habitat, dan strategi mencari makan. Ada dua bentuk pertumbuhan dasar (Gambar 1): Ragi: *B. Saccharomyces cerevisiae* yang merupakan organisme uniseluler dengan berkembang biak secara vegetatif melalui tunas, yang mana sel induk memisahkan sel anak, dan akhirnya tumbuh hingga ukuran penuh. Dinding sel tetap dapat terhubung satu sama lain, dan membentuk rantai sel. Bentuk koloni yang dihasilkan menyerupai koloni bakteri. Namun pada jamur lain, seperti *B. Botrytis cinerea* yang merupakan organisme multiseluler yang tidak konvensional, membentuk benang sel memanjang (hifa) dan jaringan bercabang (miselium), nantinya organel dan inti sel dapat bergerak bebas. Miselium yang tumbuh dari spora mewakili suatu organisme. Jamur dapat berkembang biak secara vegetatif (aseksual) dan/atau seksual. Pembentukan spora aseksual (konidia) merupakan ciri khas dari jamur.

Sel pada jamur dapat memiliki salinan gen/alel yang berfungsi dalam jumlah berbeda. Beberapa jamur memiliki satu set kromosom sederhana (haploid), yang artinya mutasi suatu gen selalu menghasilkan fenotip (selama gen tersebut mempunyai fungsi yang terlihat). Namun pada diploid dan aneuploid juga terjadi. Perbedaan jumlah salinan gen dapat disebabkan oleh beberapa alasan, seperti adanya kromosom esensial dan tambahan, distribusi kromosom yang tidak merata selama mitosis, atau duplikasi genom yang diikuti dengan hilangnya salinan gen individu. Selain itu, segmen hifa dan konidia jamur hifa dapat mengandung beberapa inti sel, yang mungkin berbeda, yang mengkompensasi kumpulan kromosom sederhana dan berkontribusi pada kemampuan adaptasinya. Terdapat banyak salinan gen/alel, modifikasi genetik seperti pengenalan mutasi tidak akan secara langsung mengarah pada ekspresi sifat tersebut, sehingga diperlukan langkah lebih lanjut untuk mendapatkan strain homozigot atau homokariotik.

**Gambar 1 | Morfologi dan Genetika Jamur**



**Gambar di bagian atas: Jamur memiliki dua bentuk pertumbuhan yang berbeda. Contoh dari koloni *Saccharomyces cerevisiae* dan miselium vegetatif dari *Botrytis cinerea*. Gambar di bagian bawah: Jumlah salinan gen yang berfungsi dalam menentukan fenotipe setelah mutasi dimasukkan ke dalam genom tipe liar. Penggunaan teknologi CRISPR-Cas9 menggeser keseimbangan demi fenotipe mutan (panah tebal).**

Penggunaan teknologi CRISPR-Cas9 pada jamur memiliki berbagai keunggulan [1]. Karena beberapa salinan/alel gen identik dapat bermutasi dalam satu langkah, memungkinkan untuk menghasilkan transforman homozigot atau homokariotik. Secara terpisah, *Double-Strand Breaks* (DSB) meningkatkan frekuensi penyuntingan dengan mengaktifkan sistem perbaikan DNA endogen. Penambahan DNA donor dengan kaset resistensi untuk seleksi menguntungkan dan memungkinkan urutan untuk dihapus atau dimasukkan. Selain itu, posisi genom yang berbeda dapat disunting pada waktu yang bersamaan.

### Jamur kolonisasi batuan membentuk koloni hitam kompak dan ekstremtoleran

Kolonisasi yang dapat menggambarkan atau mewakili habitat asli sangatlah menantang, dan sesekali

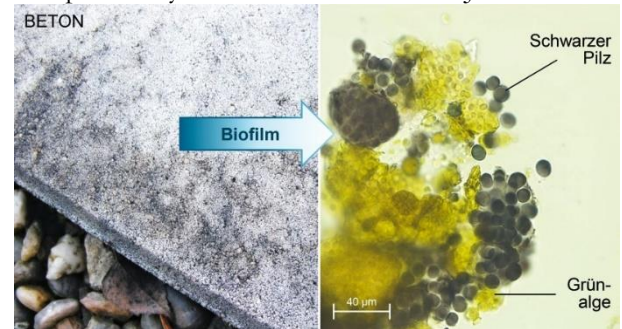
membutuhkan kerjasama antar mikroorganisme [2]. Bagaimanapun substrat dari mikroorganisme yang terpapar sinar matahari (radiasi UV) mengubah suhu dan kelembaban. Permukaan batu yang dingin dan panas merupakan habitat ekstrem di mana nutrisi atau hara menjadi langka. Sebagai contoh (Ascomycetes) dapat beradaptasi dengan habitat ekstrem tersebut melalui karakteristik morfologi dan fisiologis tertentu, seperti siklus perkembangan sederhana melalui reproduksi vegetatif eksklusif, yaitu melalui pembelahan sel dan pembentukan dinding sel berlapis-lapis dan bermelanisasi. Banyak jamur yang menghasilkan melanin hitam 1,8-Dihidroksinaftalena (DHN) dan menyimpannya di dinding struktur infeksi atau reproduksi khusus. Sebaliknya, apa yang disebut jamur hitam terkadang juga disebut jamur pelapuk batu, atau ragi hitam secara terus-menerus menghasilkan melanin, yang melindungi mereka dari banyak faktor lingkungan abiotik dan biotik, tetapi juga membatasi pertumbuhan mereka [3]. Akhirnya, agar sel anak dapat dipisahkan, lapisan melanin harus dilarutkan setidaknya secara lokal. Atau, dua sel anak terbentuk di sel induk, yang dilepaskan melalui pecahnya lapisan melanin (pertumbuhan meristematik). Koloni jamur hitam melapukkan batuan dan terlibat dalam pembentukan tanah dan dikenal karena potensi pelapukannya terhadap batuan seperti olivin [4, 5].

### Pintasan

- Jamur hitam yang berada di bebatuan merupakan bagian dari biofilm yang berwarna abu-abu kehijauan.
- Jamur hitam sangat beragam dan mudah beradaptasi di kondisi lingkungan yang ekstrem.
- Pertumbuhan yang lambat dan dinding sel besar jamur hitam memperumit prosedur molekuler, biologis dan rekayasa genetika.
- Dengan bantuan teknologi CRISPR-Cas9, sekarang memungkinkan untuk mengedit genom jamur hitam.

Jamur hitam dapat berada pada lokasi buatan manusia seperti monumen, fasad bangunan, atap, dan tata surya. Biofilm pada permukaan ini adalah komunitas mikroba jamur hitam, bakteri, dan ganggang hijau (Gambar 2) dan menyebabkan perubahan warna permukaan cahaya, perubahan bahan dan pengurangan efisiensi tata surya. Jamur berkontribusi pada penahan biofilm dan melindungi mikroorganisme lain dari iradiasi cahaya yang berlebihan melalui melanisasi mereka. Jamur hitam menunjukkan keanekaragaman yang luar biasa di kelas *Arthoniomycetes*, *Eurotiomycetes* dan *Dothideomycetes*, yang telah lama diremehkan karena penampilan mereka yang mirip (konvergensi). Sebuah proyek kolaboratif yang sedang berlangsung mengatasi kesenjangan pengetahuan ini dengan mengurutkan genom sekitar 100 jamur yang sebelumnya tidak diketahui dari

berbagai habitat ekstrem [6] (<https://stresblackfungi.org/>). Kontribusi kami untuk ini adalah 15 spesies baru yang telah diisolasi dari panel surya di Amerika Serikat dan Jerman.



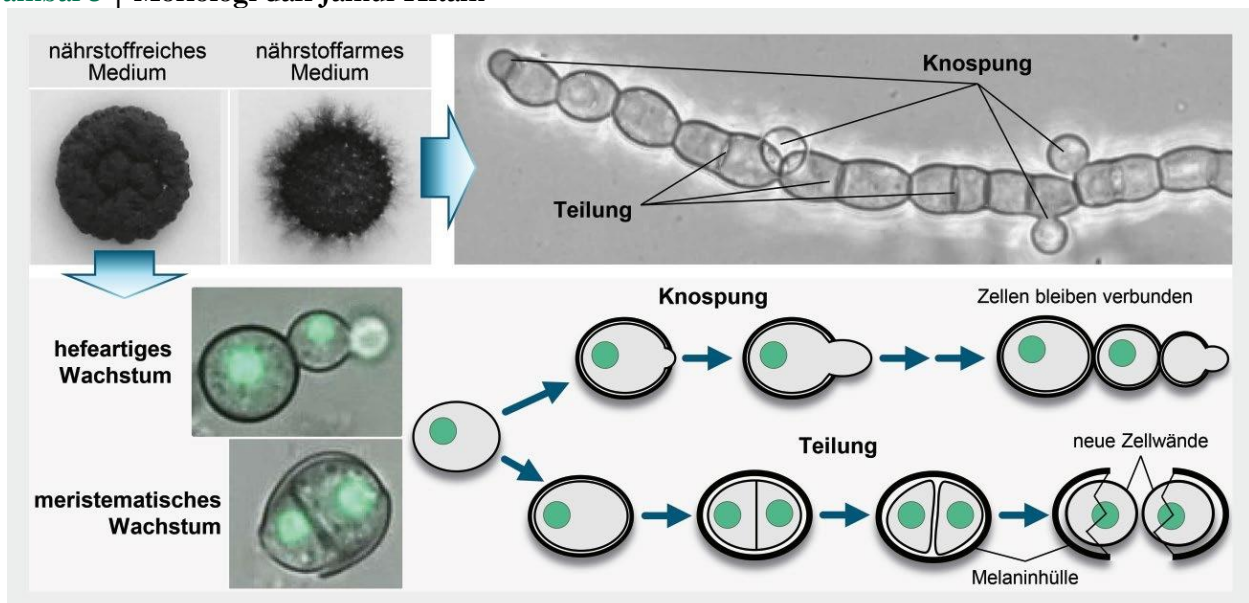
**Gambar 2 | Biofilm dengan jamur hitam dan ganggang hijau.** Foto: Pedro M. MartinSanchez.

### Pembentukan *Knufia petricola* sebagai model bahan kolonisasi jamur

*Knufia petricola* (sebelumnya *Sarcinomyces petricola*, lihat gambar utama) dan spesies *Knufia* lainnya telah diidentifikasi sebagai pelapuk dan pengurai marmer kuno di wilayah Mediterania [7–9]. Meskipun awalnya diasumsikan bahwa perwakilan ini cenderung tinggal di daerah hangat, penelitian terbaru di Antartika telah menunjukkan bahwa mereka juga berada di es [10], yang menggarisbawahi karakter ekstremotoleransi mereka dan menunjukkan distribusi di seluruh dunia. Strain *K. Petricola* A95 diisolasi dari permukaan marmer di Athena, Yunani, oleh Anna A. Gorbushina

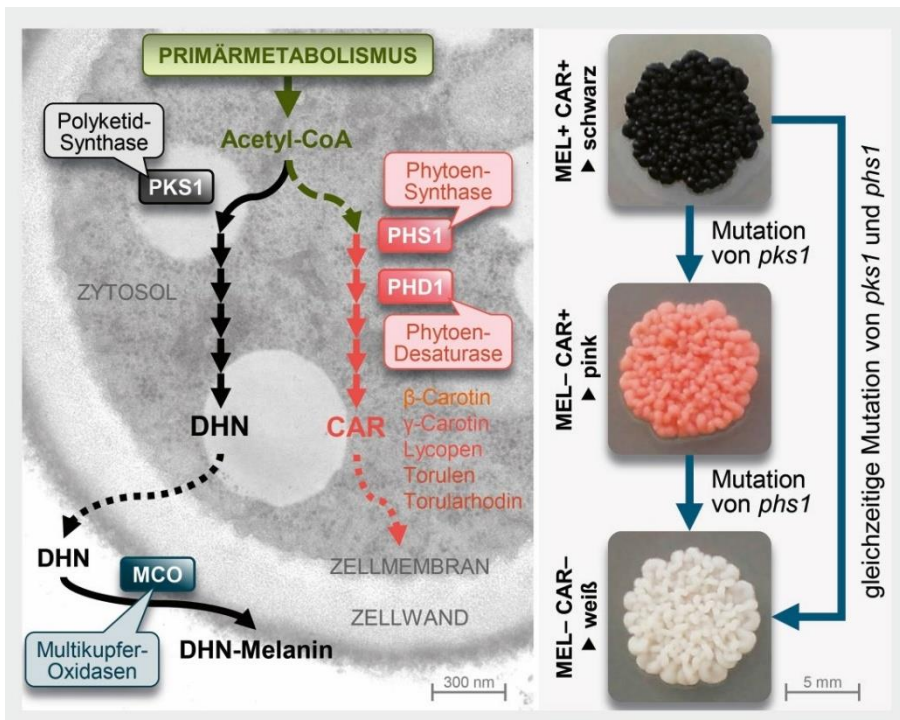
pada 1990-an dan dipilih sebagai model karena pertumbuhannya yang moderat dan kemudahan penanganan dibandingkan dengan jamur hitam terisolasi lainnya [3]. *K. Petricola* menunjukkan bentuk pertumbuhan yang berbeda tergantung pada kandungan nutrisi media (Gambar 3). Misalnya, pertumbuhan dan pembentukan koloni kompak yang lebih cepat pada media kaya kandungan nutrisi terutama pada pembelahan seperti ragi, yang mengarah pada rantai sel yang saling berhubungan. Namun, pertumbuhan meristematik juga terjadi, mungkin cara pembelahan yang lebih disukai untuk sel yang lebih tua dan lebih melanisasi.

### Gambar 3 | Morfologi dari Jamur Hitam



*Knufia petricola* bereproduksi dengan pertumbuhan seperti ragi atau meristematik. Inti sel ditandai hijau oleh *fluorescent fusion proteins* yang terdiri dari histon dan protein fluorescent hijau (GFP). Foto: Oliver Voigt, Schema nach [8].

### Gambar 4 | Pigmen dari *K. Petricola*



merasakan UV-A dan radiasi inframerah serta cahaya biru, hijau dan merah dan menggunakannya untuk mengontrol metabolisme, jam internal dan berinteraksi dengan mikroorganisme fototrofik. Seperti yang ditunjukkan oleh pewarnaan inti sel dan analisis urutan genom, sel-sel *K. Petricola* masing-masing memiliki nukleus dengan satu set kromosom sederhana. Ini berarti prasyarat ada untuk mutasi jika dapat dimasukkan untuk mengarah ke fenotipe yang terlihat.

### *K. Petricola* di tahun-tahun awal – semua awal sulit

Kreativitas dan ketekunan selalu diperlukan dalam mengembangkan metode baru.

Khas *K. Petricola* adalah pembentukan karotenoid kemerahan yang stabil pada jamur lain, ini hanya terbentuk dengan adanya cahaya yang mengarah pada pigmentasi merah muda yang intens dari koloni non-melanisasi [12]. Karotenoid tertanam di dalam membran dan dengan demikian mungkin berkontribusi pada pemeliharaan membran pada suhu yang berubah.

Pada agar air, sel-sel membentuk pseudohifa sebagai hasil dari pembelahan seperti ragi dan meristematik. *K. Petricola* menunjukkan karakteristik lain dari jamur hitam, termasuk pembentukan dinding sel berlapis dan metabolit pelindung seperti DHN-melanin, karotenoid, mikosporin, dan polisakarida ekstraseluler (EPS). Prekursor melanin hitam, 1,8-Dihydroxynaphthalene (DHN), diproduksi di dalam sel, disekresikan dan dipolimerisasi di luar sel [11] (Gambar 4).

Genom *K. Petricola* sangat kompak dengan ukuran 28,1 Mb dan sekitar 10.000 gen (Heeger *et al.*, tidak dipublikasikan). Ini mengandung gen yang dilestarikan untuk sintesis metabolit sekunder DHN-melanin, karotenoid dan siderofor yang diduga. Selain itu, tidak ada gen untuk sintesis metabolit sekunder (beracun) yang disertakan. Pengamatan ini sesuai dengan asumsi bahwa *K. Petricola* tidak bersaing dengan mikroorganisme yang tumbuh lebih cepat di lingkungan alamnya dan hidup berdampingan dengan spesies ekstremotoleran lainnya dalam biofilm atau hidup dalam hubungan simbiosis. Jumlah gen yang mengkode protein penyerap cahaya (fotoreseptor) luar biasa [13]. Menurut penelitian, *K. Petricola* dapat memiliki kemampuan untuk

Dalam kasus jamur hitam, juga memerlukan banyak kesabaran, karena tergantung pada tingkat pertumbuhan objek penelitian, berminggu-minggu atau berbulan-bulan harus berlalu untuk mendapatkan biomassa yang cukup atau untuk melihat apakah pendekatan eksperimental telah berhasil. Selain pertumbuhan yang lambat, melanin juga sebagai pengotor merupakan masalah dalam banyak metode biologi molekuler. Sel-sel melanisasi membentuk koloni kompak dan terlindungi dengan baik dari agen lisis, sehingga diperlukan langkah-langkah khusus (mekanis) untuk memisahkan atau memecah sel. Namun, dalam kedua kasus tersebut, sensitivitas diperlukan, karena sel dan makromolekul juga dapat rusak secara tidak sengaja. Oleh karena itu, metode yang seharusnya sederhana seperti ekstraksi DNA bebas melanin dan molekul tinggi untuk pengurutan genom dan aplikasi diagnostik sudah menjadi tantangan. Ini sekarang telah dikuasai untuk *K. Petricola*, dan pengalaman yang diperoleh membantu mentransfernya ke jamur hitam lainnya. Namun, karena kesulitan teknis ini, tidak banyak yang diketahui tentang biologi jamur hitam.

Rintangan terbesar untuk pengenalan DNA rekombinan (transformasi) ke dalam jamur adalah dinding sel, yang dapat memiliki komposisi yang berbeda pada spesies yang berbeda tetapi juga pada jenis sel yang berbeda dari suatu spesies. Metode yang paling penting adalah transformasi protoplas, karena ini dapat digunakan hampir secara universal. Namun, produksi protoplas sangat penting, karena hanya beberapa enzim litik yang tersedia dapat mendegradasi dinding sel jamur yang berbeda ke tingkat yang berbeda-beda. Jika memungkinkan,

miselium vegetatif muda, yang tidak mengandung melanin atau pigmen lain, digunakan untuk lisis dinding sel. Namun, opsi ini tidak ada untuk jamur hitam. Parameter untuk *K. Petricola* telah dioptimalkan sedemikian rupa sehingga protoplas, meskipun sangat sedikit, dapat diperoleh setelah inkubasi yang sangat lama dengan enzim sel-*wallytic* (16 jam dibandingkan dengan 1-2 jam untuk miselia non-melanisasi jamur seperti api). Pemisahan protoplas dari sel yang tidak terlisir sulit karena ukurannya yang sama, sehingga suspensi protoplas masih mengandung sel melanisasi dalam proporsi yang berbeda. Oleh karena itu, untuk pemilihan resistensi yang dibantu oleh DNA donor, bahan aktif selektif yang sesuai harus digunakan dalam jumlah yang cukup tinggi. Transformasi protoplas pertama yang berhasil menghasilkan transforman yang dapat tumbuh dengan adanya higromisin dengan integrasi ektopik (non-arah) dari kaset resistensi higromisin [14] (Gambar 5). Berdasarkan hal ini, protokol dioptimalkan lebih lanjut, *nat1*/Nourseothricin diimplementasikan sebagai sistem penanda seleksi kedua dan kaset ekspresi untuk protein fluorescing merah dan hijau (RFP, GFP) diintegrasikan secara ektopik ke dalam genom *K. Petricola*. Ini menunjukkan bahwa deteksi fluoresensi RFP dan GFP memungkinkan meskipun dinding sel sangat melanisasi [15].

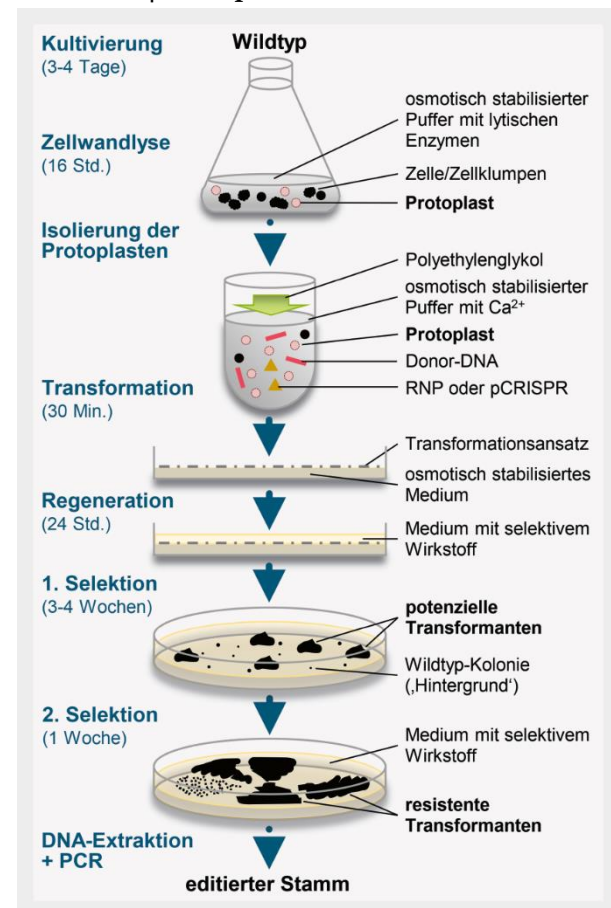
### ... dan kemudian muncul CRISPR-Cas9 Teknologi dan mengubah dunia ...

Kemampuan untuk mengubah *K. Petricola* memungkinkan penerapan teknologi CRISPR-Cas9 untuk penyuntingan genom terarah yang efisien. Karena protein dapat dimasukkan ke dalam protoplas selain DNA, dua strategi untuk penyediaan sementara komponen yang diperlukan, sgRNA spesifik target (RNA panduan tunggal) dan Cas9 memungkinkan (Gambar 6):

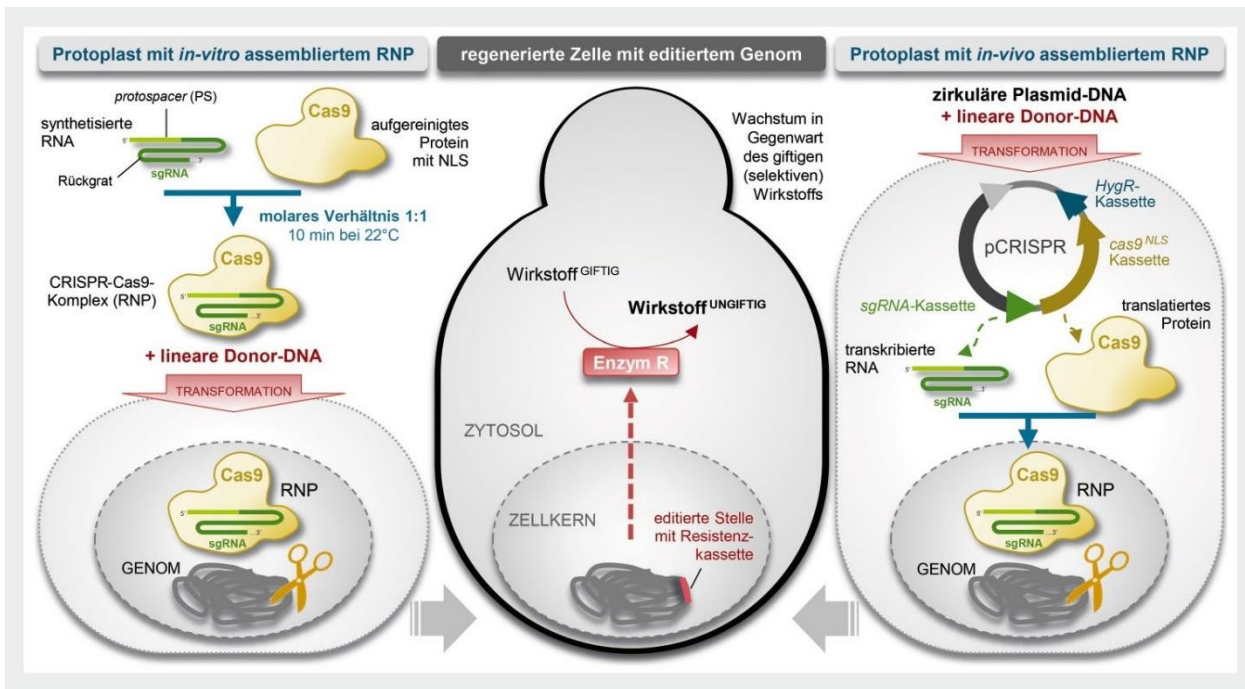
- (i) sintesis in vitro sgRNA spesifik target, perakitan dengan Cas9 yang dimurnikan dan penambahan ribonukleoprotein (RNP) dengan DNA donor ke protoplas,
- (ii) kloning plasmid dengan kaset untuk ekspresi sgRNA spesifik target dan Cas9 serta penambahan plasmid melingkar dengan DNA donor ke protoplas untuk perakitan in vivo RNP. Untuk pendekatan in vivo, plasmid digunakan, yang awalnya dirancang oleh Mortensen & rekannya untuk digunakan pada spesies *Aspergillus* [16, 17].

Gen yang kehilangannya mengarah ke fenotipe yang terlihat bekerja dengan sangat baik. Pada *K. Petricola*, gen inilah yang mengkodekan enzim kunci untuk sintesis DHN Melanin (*pks1*) dan karotenoid (*pks1*). Pertama, efisiensi untuk penghapusan *pks1* melalui pertukaran untuk kaset resistensi dibandingkan dengan metode konvensional dan strategi yang dibantu CRISPR-Cas9 (Gambar 7). Untuk tujuan ini, DNA donor terdiri dari kaset resistensi yang dipengaruhi oleh urutan non-coding 5' dan 3' dari *pks1* dengan panjang berbeda. Karena koloni berpigmen yang kompak dan berbeda pada pelat transformasi, efisiensi (tingkat KO) dapat ditentukan dengan menghitung koloni hitam dan merah muda. Hasilnya menunjukkan efek yang sangat baik dengan DSB yang dibantu CRISPR-Cas9 pada jamur kantung.

**Gambar 5 | Protoplas dari *K. Petricola***



**Gambar 6 | CRISPR-CAS9 untuk *K. Petricola***



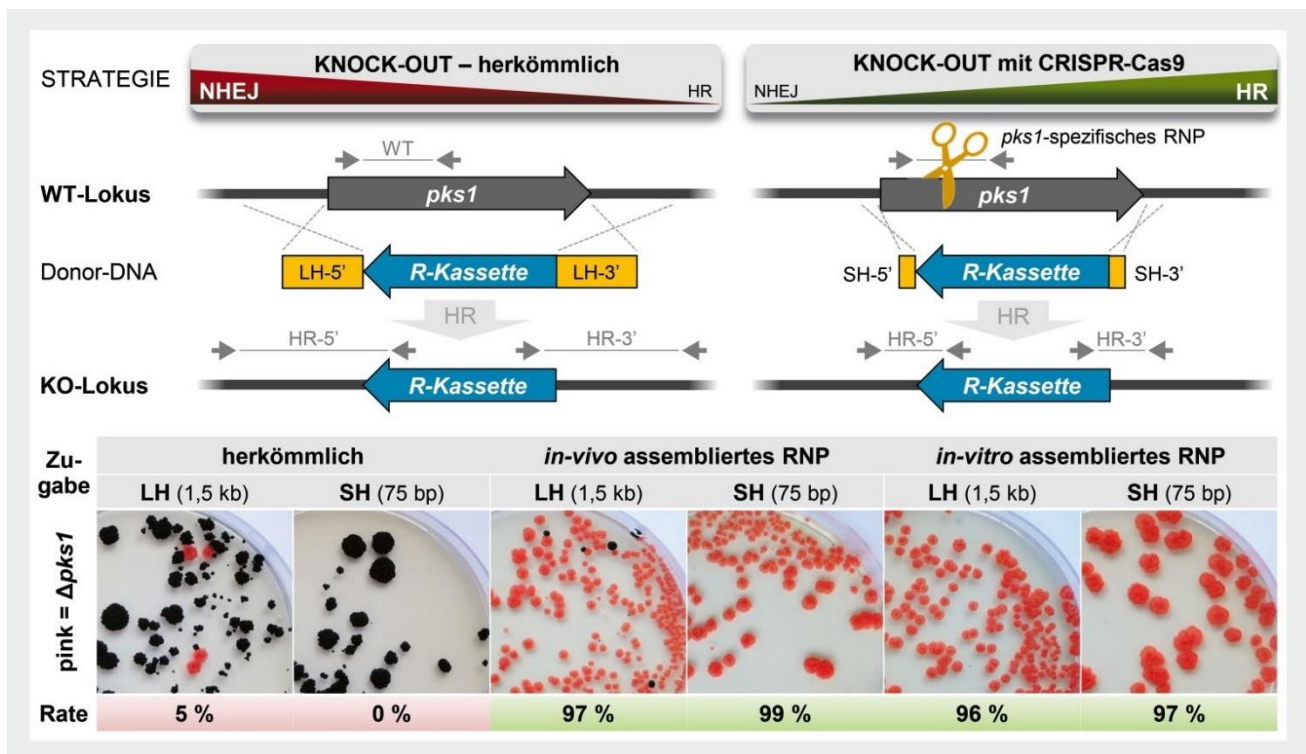
Protoplas diubah dengan DNA donor untuk mencapai peristiwa rekombinasi yang diinginkan, serta dengan ribonukleoprotein (RNP) yang dirakit secara *in vitro* atau dengan plasmid melingkar untuk ekspresi Cas9 dan sgRNA spesifik target. DNA donor mengandung kaset resistensi (R) untuk pemilihan sel yang ditransformasikan. Beberapa sgRNA dapat diekspresikan secara bersamaan dari plasmid (multiplexing), dan seleksi sementara dengan resistensi higromisin yang dikodekan (HygR) memungkinkan. NLS (sinyal lokalisasi nuklir): Urutan lokalisasi nuklir dari virus Simian 40.

Dalam kasus DSB dalam gen target (di sini *pkx1*), itu dapat ditutup dengan rekombinasi homolog (HR) menggunakan DNA donor yang disediakan (kaset resistensi dengan urutan homolog), di mana gen target ditukar dengan kaset resistansi. Karena DPO selalu dihasilkan oleh Cas9 yang ditargetkan, tingkat HR lebih tinggi. Tanpa CRISPR-Cas9, DNA donor adalah ektopik yang diintegrasikan ke dalam genom terutama melalui mekanisme perbaikan non-homolog *end-linking* (NHEJ), yang mempertahankan transan resisten tetapi masih memiliki gen target. Untuk pendekatan konvensional, urutan homolog panjang diperlukan, yang harus digabungkan dalam vektor kloning dengan kaset resistansi. Kaset resistansi dengan urutan homolog pendek, di sisi lain, dapat diproduksi bebas klon dalam reaksi berantai polimerase (PCR) menggunakan primer dengan overhang 5'. Faktanya, kedua strategi CRISPR-Cas9, perakitan *in vitro* vs. *in vivo*, sama-sama efisien dalam interaksi dengan kedua jenis DNA donor, karena mereka menghasilkan hampir secara eksklusif merah muda, yaitu, transforman  $\Delta$ *pkx1*. Sebaliknya, lima

persen dan nol persen adalah singkatan dari metode konvensional dengan urutan homolog panjang dan pendek.

Dengan kedua strategi CRISPR-Cas9, transforman putih juga dapat dihasilkan oleh penghapusan *pkx1* dan *phs1* secara simultan dengan mengubah protoplas tipe liar dengan dua sgRNA untuk DSB di *pkx1* dan *phs1* dan DNA donor yang sesuai yaitu dua kaset resistensi berbeda yang masing-masing disukai oleh urutan *pkx1* dan *phs1* [15, 18]. Kedua strategi, *in vitro* dan *in vivo*, lebih lanjut menunjukkan bahwa Cas9 memasuki inti *K. Petricola* dalam kedua kasus karena urutan lokalisasi nuklir yang melekat dan bahwa urutan homolog pendek sudah cukup untuk efisiensi penyuntingan gen. Plasmid untuk ekspresi sgRNA dan Cas9 hanya memiliki waktu paruh yang pendek pada *K. Petricola* (tidak ada replikasi), sehingga tidak lagi terdeteksi pada transforman. Pada saat yang sama, ini menunjukkan bahwa plasmid tidak terintegrasi ke dalam genom *K. Petricola*, yang akan menyebabkan transforman tahan higromisin yang tumbuh cepat.

**Gambar 7 | Pemisahan bagian dari Genom *K. Petricola* (KNOCK-OUT)**



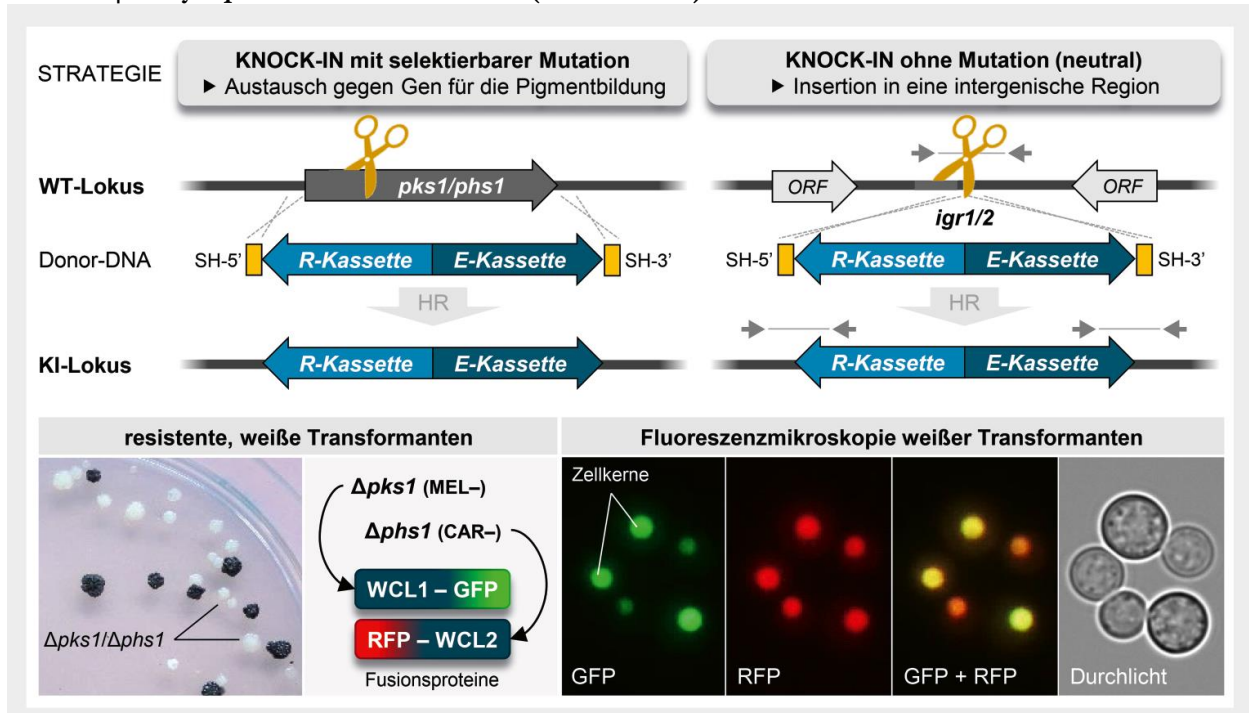
Pendekatan konvensional dan pendekatan berbantuan CRISPR-Cas9 menggunakan DNA donor dengan urutan panjang (LH = homolog panjang) dan homolog pendek (SH = homolog pendek) untuk knock-out (KO) *pks1*. Sebagai akibat dari putus untai ganda pada *pks1* – tidak disengaja atau disebabkan oleh RNP spesifik *pks1* – *pks1* ditukar dengan kaset resistansi (kaset-R) karena rekombinasi homolog (HR). Pasangan primer untuk mendeteksi KO (HR-5' dan HR-3') dan tidak adanya gen target (WT) ditampilkan sebagai panah abu-abu. Tingkat KO (koloni merah muda/semua koloni) ditunjukkan. NHEJ (non-homolog end-joining): non-homolog end-joining. Setelah [15].

### K. *Petricola* hari ini – kotak peralatan yang lengkap untuk analisis

Ketersediaan dua strategi untuk CRISPR-Cas9 sementara membuka perspektif, dan strategi yang lebih sederhana dan lebih hemat biaya dapat dikejar dalam setiap kasus. Penggunaan RNP yang diproduksi secara in vitro lebih disukai untuk menghindari kloning. Penggunaan plasmid menguntungkan untuk gen target yang sering digunakan karena DNA plasmid dapat diproduksi dengan murah dan disimpan dengan mudah. Selain itu, ekspresi dari dua atau lebih sgRNA dari plasmid memungkinkan penyuntingan berlangsung bersamaan dari dalam genom (informasi). Untuk tujuan ini, sistem seleksi lebih lanjut telah diterapkan, sehingga tersedia total lima kaset resistansi untuk *K. Petricola*.

Selama pekerjaan kami, kami dapat meningkatkan strategi untuk mutasi simultan beberapa gen dengan mengadaptasi DNA donor. Penambahan oligonukleotida DNA beruntai tunggal yang disintesis, terdiri dari 50 nukleotida dari setiap urutan homolog ke daerah non-coding 5' dan 3' dari gen target, sudah cukup untuk HR. Akibatnya, area pengkodean gen target dihilangkan. Beberapa gen dapat dihapus dengan ekspresi beberapa Cas9 yang ditargetkan dari plasmid dan penambahan DNA donor dengan kaset resistansi serta oligonukleotida DNA untuk semua gen lain (sesuai dengan sgRNA yang ditambahkan). Sejauh ini, empat gen telah dimatikan dalam satu langkah dengan strategi ini, dan pada fase kedua, empat gen lainnya telah dimatikan pada mutan empat kali, menghasilkan strain *K. Petricola* pertama dengan KO delapan.

**Gambar 8 | Penyisipan Genom *K. Petricola* (KNOCK-IN)**



Atas: Kaset ekspresi (E-kaset) dengan gen asing atau sendiri dapat dimasukkan ke dalam genom *K. Petricola* dengan cara yang berbeda. Bawah: Seleksi transforman hitam-putih untuk lokalisasi dua protein lokal nuklir (WCL1, WCL2) dengan *fusion* dengan GFP atau RFP. Karena hanya pertukaran kedua gen pigmen dengan konstruksi ekspresi yang mengarah ke transforman putih, ini dapat digunakan langsung untuk mikroskop fluoresensi. AI: Knock-in. Setelah [18].

Selain mematikan gen untuk identifikasi fungsinya dalam organisme, ekspresi gen adalah metode penting lainnya. Misalnya, lokalisasi produk gen dapat ditentukan oleh ekspresi *fluorescent fusion proteins*. Selanjutnya, dapat diuji apakah gen yang tidak berubah/diubah atau gen dari organisme lain berfungsi. Secara konvensional, konstruksi ekspresi yang terdiri dari resistensi dan kaset ekspresi dimasukkan ke dalam genom dengan integrasi ektopik karena tingkat HR yang tidak mencukupi pada sebagian besar jamur. Dalam banyak kasus, ini memungkinkan ekspresi gen yang diinginkan, tetapi tergantung pada lokasi integrasi dalam genom, gen dapat diekspresikan ke tingkat yang berbeda. Dalam kasus terburuk, integrasi ke dalam wilayah pengkodean terjadi dan dengan demikian menyebabkan gangguan gen. Dengan menggunakan teknologi CRISPR-Cas9, konstruksi ekspresi sekarang dapat secara khusus dimasukkan ke dalam genom, menghasilkan transforman yang identik secara genetik dan menyederhanakan studi ekspresi komparatif. Untuk *K. Petricola*, ada berbagai kemungkinan untuk knock-in (AI) dari konstruksi ekspresi (Gambar 8). Pertukaran gen pigmen ( $pks1 \rightarrow$  seleksi hitam-merah

muda) atau kedua gen pigmen ( $pks1 + phs1 \rightarrow$  seleksi hitam-putih) dalam strain liar memungkinkan deteksi peristiwa integrasi yang berhasil karena pigmentasi yang berubah dan menguntungkan untuk studi lokalisasi, di mana banyak konstruksi berbeda sering harus dipantau. Penyisipan netral ke dalam genom, yaitu tanpa mempengaruhi gen lain, berbagai daerah intergenik divalidasi secara eksperimental sebagai lokasi penyisipan yang sesuai. Penyisipan itu sendiri telah terbukti tidak mengarah pada fenotipe yang berubah, karena tidak ada urutan yang dihapus atau diinterupsi, sehingga kemungkinan fenotipe dari strain ekspresi hanya didasarkan pada gen yang dimasukkan [18]. Menggunakan plasmid untuk ekspresi Cas9 dan beberapa sgRNA dan DNA donor yang sesuai (mungkin juga tanpa kaset resistensi), beberapa konstruksi ekspresi juga dapat dimasukkan ke dalam genom *K. Petricola* pada saat yang bersamaan. Selanjutnya, dengan menggunakan peptida 2A virus dan sistem tet-onregulasi sintesis, memungkinkan untuk mengekspresikan beberapa gen dari konstruksi dalam lokus gen secara terkontrol dengan menambahkan penginduksi doxycycline [19] (Gambar 9).

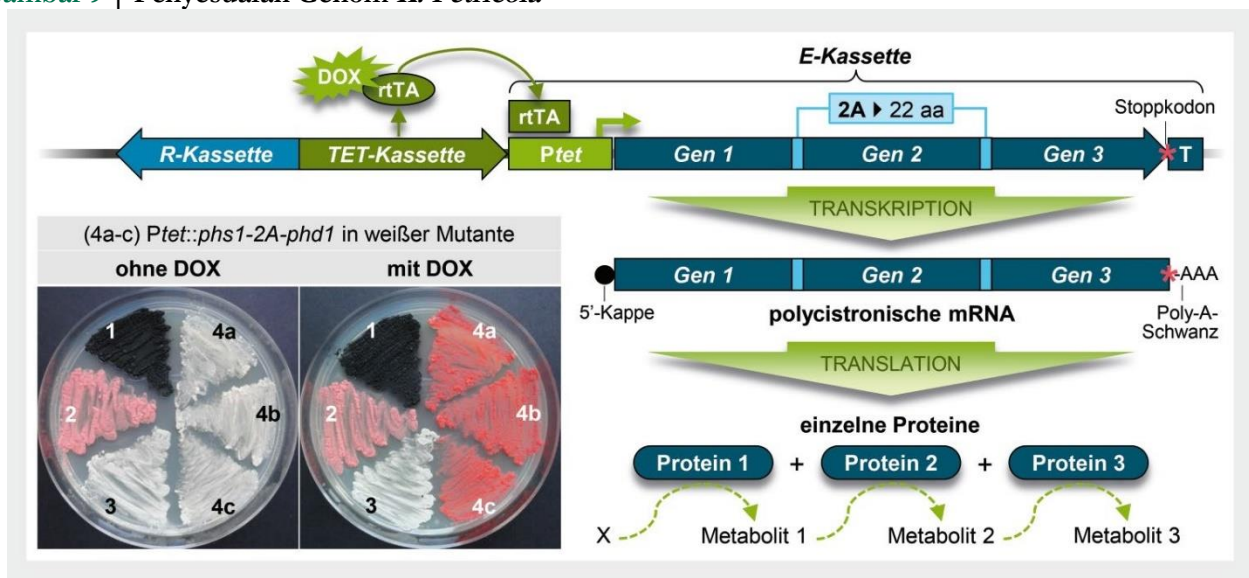


## Ke depannya – dari batu ke bahan baru, ke dalam fermentor atau ke ruang penyimpanan?

Dengan teknologi CRISPR-Cas9, memungkinkan untuk menyunting genom *K. Petricola* secara ditargetkan untuk menjawab pertanyaan tentang biologi jamur kolonisasi batuan, ekstraksi biofilm di daerah perkotaan, teknologi pengikat CO<sub>2</sub> seperti pelapukan batuan dan kerusakan bahan. Model biofilm yang mengandung *K. Petricola* dan cyanobacteria dan/atau ganggang hijau dalam proporsi yang berbeda dapat digunakan untuk tujuan ini. Dengan bantuan model *K. Petricola*, pertanyaan tentang jamur hitam patogen manusia terkait, yang sejauh ini hanya sedikit diteliti dan dapat dijawab.

Pada saat yang sama, teknik yang ada serta sifat intrinsiknya menjadikan *K. Petricola* sistem ekspresi eukariotik yang cocok untuk produksi metabolit sekunder dan protein (yang disekresikan). Dengan menukar gen pigmen untuk konstruksi ekspresi, sel-sel ragi putih yang tumbuh secara individual tercipta yang mengakumulasi asetil-KoA, yang dapat digunakan untuk sintesis lainnya. Selain itu, jamur tidak memiliki gen untuk pembentukan metabolit sekunder lain yang tidak diinginkan atau enzim yang disekresikan yang mendegradasi dinding sel, tetapi berbeda dengan ragi roti *Saccharomyces cerevisiae*, ia dapat menanggung beban sintesis metabolit sekunder konstitutif dan sekresi protein.

Gambar 9 | Penyesuaian Genom *K. Petricola*



Sistem Tet-On berisi dua komponen: kaset untuk ekspresi kontinu dari transaktivator rtTA (TET) dan promotor yang bergantung pada rtTA (Ptet). rtTA mengubah konformasinya dengan mengikat doxycycline (DOX) dan mengaktifkan Ptet, yang mentranskripsikan gen hilir. Motif virus 2A dapat memadukan dua atau lebih gen. Kiri bawah: contoh penggunaan teknik di *K. Petricola*. Konstruksi tet-on untuk gen karotenoid *phs1* dan *phd1* diperkenalkan ke dalam mutan putih (3 –  $\Delta pks1/\Delta phs1-phd1$ ). Strain yang dihasilkan (4a-c) memproduksi karotenoid secara berlebihan ketika DOX penginduksi ditambahkan. 1: Wildtyp, 2:  $\Delta pks1$ . T: Terminator. Setelah [19].

Selain itu, pengalaman dan protokol yang diperoleh berguna untuk membangun penyuntingan genom yang ditargetkan pada jamur lain yang sebelumnya sulit diakses. Di laboratorium kami, kami mengambil tantangan untuk memanipulasi secara genetik organisme eukariotik apa yang mungkin paling toleran terhadap stres, *Cryomyces antarcticus*. *C. antarcticus* di Antartika dan beradaptasi dengan suhu rendah dan radiasi UV yang kuat [20]. Karena sifat-sifat ini, telah lama digunakan sebagai organisme uji dalam penelitian astrobiologi untuk menyelidiki batas kehidupan dalam kondisi ekstrem (seperti Mars) [21]. Jamur tumbuh sangat lambat, secara eksklusif melalui pembelahan sel meristematik, sehingga pembentukan

koloni seukuran kepala jarum memakan waktu lebih dari sebulan. Akibatnya, prosedur dari produksi biomassa untuk produksi protoplas hingga analisis genotip memakan waktu 9-10 bulan. Akhirnya, mutan nonmelanisasi dapat dihasilkan, yang sekarang digunakan untuk penelitian [22]. Ini sekali lagi menunjukkan pentingnya teknologi CRISPR-Cas9 pada jamur. Ini karena genom *C. antarcticus* terutama mengandung gen dalam dua salinan, meskipun masih belum jelas apakah genom tersebut diploid atau aneuploid karena duplikasi gen dan kehilangan gen berturut-turut.

## Ringkasan

Jamur hitam di batuan dapat beradaptasi dengan kondisi yang panas di gurun dan melepaskan mineral dari bebatuan. Adaptasi yang sama memungkinkan jamur ini hidup di permukaan terbuka buatan manusia seperti monumen, fasad bangunan, dan tata surya. Jamur hitam sering dikaitkan dengan mikroorganisme fototrofik. Pertumbuhan yang lambat dan dinding sel melanisasi yang melindungi jamur dari pengaruh lingkungan yang ekstrem memperumit prosedur biologis molekuler dan rekayasa genetika, yang berarti bahwa hampir tidak ada yang diketahui tentang biologi jamur ini sejauh ini. *Knufia petricola* yang mewakili dipilih untuk memahami proses kolonisasi dan kerusakan bahan menggunakan metode yang disesuaikan seperti penyuntingan genom yang dibantu CRISPR-Cas9.

## Ikhtisar

### CRISPR-Cas9 dalam bahan penelitian

Jamur hitam yang menghuni batu beradaptasi dengan kehidupan yang keras di bebatuan di gurun dan melepaskan mineral dari bebatuan. Adaptasi yang sama memungkinkan jamur hitam dapat hidup di permukaan terbuka buatan manusia seperti monumen, fasad bangunan, dan tata surya. Jamur hitam sering dikaitkan dengan mikroorganisme fototrofik. Pertumbuhan yang lambat dan dinding sel melanisasi, yang melindungi jamur dari gangguan lingkungan yang ekstrem, membuat metode biologis molekuler dan rekayasa genetika menjadi sulit, itulah sebabnya sedikit yang diketahui tentang biologi jamur ini. *Knufia petricola* dipilih untuk mengetahui proses kolonisasi dan kerusakan bahan dengan bantuan metode yang disesuaikan seperti penyuntingan genom yang dibantu CRISPR-Cas9.

## Ucapan Terima Kasih

Terima kasih banyak kepada semua mantan dan karyawan saat ini di kelompok penelitian Knufia. Eksperimen genetik Steff Noack-Schönmann, Oliver Voigt dan Nicole Knabe sangat penting – mereka membuka jalan bagi penggunaan CRISPR-Cas9 di *K. Petricola*. Terima kasih kepada Anna A. Gorbushina tentang penggunaan *K. Petricola* sebagai bahan dalam penelitian. Penulis juga berterima kasih kepada Institut Federal untuk Penelitian dan Pengujian Material (BAM) atas dukungan finansialnya atas pekerjaan tersebut.

## Kata kunci:

*Knufia petricola*, jamur hitam, biofilm, pigmen, penyuntingan genom, multiplexing, *resistance cassette*, transforman.

## Daftar Pustaka

- [1] M. Schuster, R. Kahmann (2019). CRISPR-Cas9 genome editing approaches in filamentous fungi and oomycetes. *Fungal Genet Biol* 130, 43–53.
- [2] A. A. Gorbushina (2007). Life on the rocks. *Environ Microbiol* 9, 1613–1631.
- [3] D. Tesei (2022). Black fungi research: out-of-this-world implications. *Encyclopedia* 2, 212–229.
- [4] T. D. W. Corbett *et al.* (2024). Organic carbon source controlled microbial olivine dissolution in small-scale flow-through bioreactors, for CO<sub>2</sub> removal. *npj Mater Degrad* 8, 34.
- [5] R. Gerrits *et al.* (2020). How the rock-inhabiting fungus *K. Petricola* A95 enhances olivine dissolution through attachment. *Geochim Cosmochim Acta* 282, 76–97.
- [6] L. Selbmann *et al.* (2020). Shed light in The dark lineageS of the fungal tree of life - STRES. *Life* 10.
- [7] A. A. Gorbushina *et al.* (1993). Role of black fungi in color change and biodeterioration of antique marbles. *Geomicrobiol J* 11, 205–221.
- [8] U. Wollenzien *et al.* (1995). On the isolation of microcolonial fungi occurring on and in marble and other calcareous rocks. *Sci Total Environ* 167, 287–294.
- [9] U. Wollenzien *et al.* (1997). *Sarcinomyces petricola*, a new microcolonial fungus from marble in the Mediterranean basin. *Antonie van Leeuwenhoek* 71, 281–288.
- [10] L. Selbmann *et al.* (2021). Culture-dependent and amplicon sequencing approaches reveal diversity and distribution of black fungi in Antarctic cryptoendolithic communities. *J Fungi (Basel)* 7.
- [11] R. Breitenbach *et al.* (2022). The role of extracellular polymeric substances of fungal biofilms in mineral attachment and weathering. *npj Mater Degrad* 6, 42.
- [12] K. Flieger *et al.* (2018). Development of an improved carotenoid extraction method to characterize the carotenoid composition under oxidative stress and cold temperature in the rock-inhabiting fungus *Knufia petricola* A95. *J Fungi* 4, 124.
- [13] J. Schumacher, A. A. Gorbushina (2020). Light sensing in plant and rock-associated black fungi. *Fungal Biol* 124, 407–417.
- [14] S. Noack-Schönmann *et al.* (2014). Genetic transformation of *Knufia petricola* A95 – a model organism for biofilm-material interactions. *AMB Express* 4, 80.
- [15] O. Voigt *et al.* (2020). An advanced genetic toolkit for exploring the biology of the rock-inhabiting black fungus *Knufia petricola*. *Sci Rep* 10, 22021.
- [16] C. S. Nødvig *et al.* (2015). A CRISPR-Cas9 system for genetic engineering of filamentous fungi. *PLoS One* 10, e0133085.

- [17] C. S. Nødvig *et al.* (2018). Efficient oligo nucleotide mediated CRISPR-Cas9 gene editing in *Aspergilli*. *Fungal Genet Biol* 115, 78–89.
- [18] E. A. Erdmann *et al.* (2022). Genetic engineering of the rock inhabitant *Knufia petricola* provides insight into the biology of extremotolerant black fungi. *Front Fungal Biol* 3, 862429.
- [19] E. A. Erdmann *et al.* (2024). The Tet-on system for controllable gene expression in the rock-inhabiting black fungus *Knufia petricola*. *Extremophiles* 28, 38.
- [20] L. Selbmann *et al.* (2005). Fungi at the edge of life: cryptoendolithic black fungi from Antarctic desert. *Stud Mycol* 51, 1–32.
- [21] S. Onofri *et al.* (2020) The amazing journey of *Cryomyces antarcticus* from Antarctica to space. In *Extremophiles as astrobiological models* (Seckbach, J. *et al.*, eds). pp. 237–254, Wiley.
- [22] I. Catanzaro *et al.* (2024). Deletion of the polyketide synthase encoding gene *pks1* prevents melanization in the extremophilic fungus *Cryomyces antarcticus*. *IUBMB Life*, <https://doi.org/10.1002/iub.2895>.

#### Ditulis oleh:



Julia Schumacher belajar biologi, menerima gelar doktornya pada tahun 2008 dan pulih pada tahun 2017 – semuanya di University of Münster. Sejak 2018, ia telah bekerja sebagai asisten peneliti di Departemen Material dan Lingkungan Institut Federal untuk Penelitian dan Pengujian Material (BAM) di Berlin dan telah mengajar sebagai dosen privat di Freie Universität Berlin sejak 2021. Dia melakukan penelitian tentang berbagai aspek mikologi molekuler seperti pentingnya cahaya bagi jamur yang terkait dengan organisme fototrofik.

#### Korespondensi

PD Dr. Julia Schumacher  
Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung (BAM)  
Abteilung 4 Material und Umwelt  
Unter den Eichen 87  
12205 Berlin  
E-Mail: [Julia.Schumacher@bam.de](mailto:Julia.Schumacher@bam.de)

#### Penerjemah dalam Bahasa Indonesia:



Muhammad Al Dhafa Darren Jawda, S.P. merupakan Alumnus Universitas Brawijaya Program Studi Agroekoteknologi Minat Manajemen Sumberdaya Lahan tahun 2024.

#### Kontak:

Malang  
65141  
Email: [muhammadaldhafadarrenjawda@gmail.com](mailto:muhammadaldhafadarrenjawda@gmail.com)

#### Sumber Makalah:

Makalah ini awalnya diterbitkan dalam bahasa Jerman di *BiuZ* Bd. 54 (2024), edisi khusus (<https://www.biuZ.de/index.php/biuZ/issue/view/486>)

#### Terjemahan dibantu oleh:

Google Translate, Microsoft Word, dan KKBI (untuk mencari sinonim kata).