



Методы геномного редактирования дрожжей: история и современное состояние

А.С. Розанов¹✉, В.Н. Шляхтун¹, Л.А. Текутьева^{2,3}, О.М. Сон^{2,3}, С.В. Сизова^{4,5}, С.Е. Пельтек¹

¹ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, Россия

³ ООО «АРНИКА», Владивосток, Россия

⁴ ЗАО «Центр новых технологий и бизнеса», Москва, Россия

⁵ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия

Дрожжи являются модельным эукариотическим организмом, на котором отрабатываются многие предположения о работе генома, а также методы его редактирования. Наиболее часто в исследовательских работах используют *Saccharomyces cerevisiae*, которые очень хорошо приспособлены физиологически к культивированию в условиях биореактора и признаны абсолютно безопасными. В последнее десятилетие методы генетической инженерии дрожжей претерпели значительные изменения. Появились новые инструменты, которые пришли из смежных направлений и позволили значительно ускорить процесс получения новых штаммов. Прежде всего это белки для направленного внесения изменений в последовательность ДНК. Длительное время методы редактирования генома дрожжей базировались на использовании их собственной системы гомологичной рекомбинации. Она удобна и удовлетворяла потребности исследователей на протяжении нескольких десятилетий, до того времени, когда на первый план стали выходить высокопроизводительные методы. Во втором десятилетии XXI века произошло бурное развитие высокопроизводительных подходов, в первую очередь методов анализа в биологии: геномики, транскриптомики, протеомики, метаболомики, интерактомики и др. Сформировалась биоинформационная база, которая позволила быстро обрабатывать растущий поток информации и моделировать клеточные процессы. В результате скорость анализа и предсказания мишеней для редактирования генома стала превышать скорость их получения, что, естественно, обусловило поиск новых методов генетической инженерии. Особенно сильно этот процесс затронул работы по модификации свойств микроорганизмов. Современные задачи стали требовать не единичных модификаций, а десятков и сотен, а иногда тысяч модификаций. В результате исследователи, занимающиеся дрожжами, стали вовлекать в работу новые инструменты геномного редактирования, которые ранее развивались для изучения более сложных объектов, таких как животные, растения, клеточные линии и др. Современные методы геномной инженерии дрожжей позволяют вносить несколько модификаций в геном за один шаг. В данном обзоре рассматривается вопрос применения и перспектив дальнейшего развития методов направленного редактирования генома в инженерии дрожжей.

Ключевые слова: дрожжи; *Saccharomyces cerevisiae*; генетическая инженерия; ZFN; цинковые пальцы; TALENS; CRISPR/Cas; Аргонавт.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Розанов А.С., Шляхтун В.Н., Текутьева Л.А., Сон О.М., Сизова С.В., Пельтек С.Е. Методы геномного редактирования дрожжей: история и современное состояние. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(8):969-978. DOI 10.18699/VJ17.321

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Rozanov A.S., Shlyahyun V.N., Tekutieva L.A., Son O.M., Sizova S.V., Peltek S.E. Methods of yeast genome editing. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selektcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(8):969-978. DOI 10.18699/VJ17.321 (in Russian)

УДК 631.466.15:602.64

Поступила в редакцию 26.07.2017

Принята к публикации 11.10.2017

© АВТОРЫ, 2017

✉ e-mail: sibiryak.n@gmail.com

Methods of yeast genome editing

A.S. Rozanov¹✉, V.N. Shlyahyun¹, L.A. Tekutieva^{2,3}, O.M. Son^{2,3}, S.V. Sizova^{4,5}, S.E. Peltek¹

¹ Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

² Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russia

³ Arnika, Ltd., Vladivostok, Russia

⁴ Closed Joint Stock Company "Center for New Technologies and Business", Moscow, Russia

⁵ Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow, Russia

Yeasts are a convenient model eukaryote used for genome studies and genome editing. *Saccharomyces cerevisiae* is the species most widely employed in biotechnology, since it is easily cultivated in bioreactors and is absolutely safe. The last decade saw a significant development of methods of yeast genetic engineering and the creation of novel instruments adapted from other fields, which allowed one to significantly accelerate the construction of new strains. The most prominent examples are the proteins used for directed DNA editing. For a long time, yeast genome engineering was based on the yeasts' system of homologous recombination. It was sufficient for several decades before the development of high-throughput methods. Many high-throughput methods were developed in the second decade of the XXI century, including those used in genomics, transcriptomics, proteomics, metabolomics, interactomics, etc. Modern bioinformatic databases now allow one to rapidly process the increasing flow of information and model cellular processes. As a result, the rate of analysis and prediction of targets for genome editing is currently higher than the rate of genome editing, which led to the development of new methods of genetic engineering. This process was particularly pronounced for microorganisms. Modern tasks require tens, hundreds, sometimes even thousands of genome modifications, which made researchers to look for new techniques. As a result, the instruments used for more complex objects, such as animals, plants, and cell lines, were adapted for yeasts. Modern methods for yeast genome editing allow introducing several modifications into the genome in a single step. In this study, we review the methods of directed genome editing and their applications and perspectives for yeasts.

Key words: yeast; *Saccharomyces cerevisiae*; genetic engineering; ZFN; zinc fingers; TALENS; CRISPR/Cas; Argonaut; NgAgo.

Дрожжи – модельный эукариотический организм, на котором отрабатываются многие предположения о работе генома, а также методы его редактирования. Чаще всего в исследовательских работах используют *Saccharomyces cerevisiae*, которые физиологически очень хорошо приспособлены к культивированию в условиях биореактора и признаны абсолютно безопасными. История их применения насчитывает не одно тысячелетие. С развитием промышленной биотехнологии дрожжи также нашли свою нишу (Botstein et al., 1997; Jensen, Keasling, 2015). Использование дрожжей в современной биотехнологии весьма распространено (рис. 1), и если раньше это были природные штаммы, то теперь уровень их модификации бывает очень высоким.

Устойчивое изменение свойств организма возможно только за счет модификации его генома. На первых этапах исследователи занимались изучением свойств генома посредством нокаута отдельных генов или изменения экспрессией какого-то одного гена. По мере накопления опыта и знаний требования к методам направленного редактирования генома все более усложняются, биомодификаций становится больше и растут требования к надежности и точности. В настоящее время наиболее процессивные методы редактирования генома используют для бактерий. Более сложно организованные объекты, такие как животные и растения, со временем тоже требуют большей процессивности. Особенно остро вопрос эффективности методов преобразования генома для микроорганизмов встал, когда методы биоинформатики и аналитические подходы позволили предсказывать и анализировать сложные модельные эксперименты, требующие модификации и тонкой регуляции большого числа генов и метаболических путей (Lechner et al., 2016). Уже сейчас для отдельных задач в биологии необходимы сотни и тысячи модификаций. Из числа решенных одной из самых объемных задач можно считать получение штамма *Escherichia coli* с уменьшенным числом кодонов. В ходе достижения этой цели был получен геном, содержащий более 62 000 модификаций (Ostrov et al., 2016). Эта работа представляет вариант синтеза генома *de novo*, но хорошо демонстрирует, какие объемы модификаций в настоящее время задействованы в передовых исследованиях.

Наиболее известной работой, выполненной на дрожжах, является воссоздание метаболического пути биосинтеза артемизинина в *S. cerevisiae*. Изначально этот метаболит был обнаружен в полыни *Artemisia annua*. Артемизинин оказался очень эффективен при малярии, но из биомассы полыни невозможно извлекать его в количествах, достаточных для обеспечения широкого круга заболевших. Тогда группа ученых под руководством J. Keasling получила рекомбинантный штамм дрожжей, способный производить артемизининовую кислоту, из которой химически получали артемизинин в количестве 25 г/л. Благодаря этому способу новое лекарство стало доступным даже для жителей беднейших стран, где распространена малярия (Paddon et al., 2013). Для этого в геном пекарских дрожжей были внесены 12 генов и отрегулирована их совместная работа.

Кроме того, в настоящее время выполнены или выполняются несколько проектов, связанных с перестройкой

метаболизма дрожжей, получением продуцентов биотоплива и компонентов химического синтеза (Nielsen et al., 2013), синтезом терпеноидов (Wriessnegger, Pichler, 2013) и др. Подобные задачи требуют сотен модификаций, которые должны выполняться быстро и надежно, и соответствующих инструментов, развитием которых занимается множество лабораторий.

Современные инструменты для направленного редактирования генома дрожжей

Методы направленного редактирования генома дрожжей развивались параллельно с общими методами молекулярной биологии. С точки зрения редактирования генома, дрожжи оказались очень хорошим объектом. Благодаря высокому уровню гомологичной рекомбинации, на начальных этапах необходимость развития методов направленного редактирования генома дрожжей не волновала исследователей, вплоть до второго десятилетия XXI века. Первые инструменты, ZFN и TALENS, оказались слишком трудозатратными, чтобы вытеснить классические методики. Дрожжи при этом использовались как вспомогательный материал для редактирования генома более сложных объектов (Kuijpers et al., 2013). Однако требования к количеству вводимых в геном изменений, их точности и скорости введения постоянно растут, и для современного процесса получения модифицированных штаммов необходимы большие возможности, чем в случае применения естественных механизмов клетки дрожжей. В 2012 г. для редактирования генома эукариот начали использовать систему CRISPR/Cas, которая по своей эффективности конкурировала с классическими методами редактирования генома дрожжей. В 2016 г. был открыт еще один белок, перспективный для геномного редактирования, – Аргонавт. К сожалению, в настоящий момент достоверно показана работоспособность только его термофильных вариантов. Несмотря на это, подобный белок мог бы значительно обогатить возможности генетической инженерии свободноживущих одноклеточных организмов.

Цинковые пальцы

Одним из первых современных инструментов для направленного редактирования генома стали так называемые цинковые пальцы (ZFNs) – нуклеазы, способные узнавать определенный сайт ДНК за счет группы ДНК-связывающих белковых доменов, имеющих аналогичное название. Они содержат характерный участок, который включает два цистеиновых и два гистидиновых остатка. Эти аминокислоты образуют хелатный комплекс с ионом цинка, а расположенная между ними полипептидная цепочка выделяется в виде пальца. Каждый цинковый палец может узнавать определенную последовательность ДНК из трех нуклеотидов и специфично связываться с ней. Цинк здесь играет структурную роль, способствуя стабильности домена (Kim et al., 1996). Цинковые пальцы входят в состав белков, в основном транскрипционных факторов, которые играют важную роль в различных клеточных процессах, таких как репликация, репарация, транскрипция, трансляция, метаболизм, передача сигналов, пролиферация клеток, апоптоз и др.

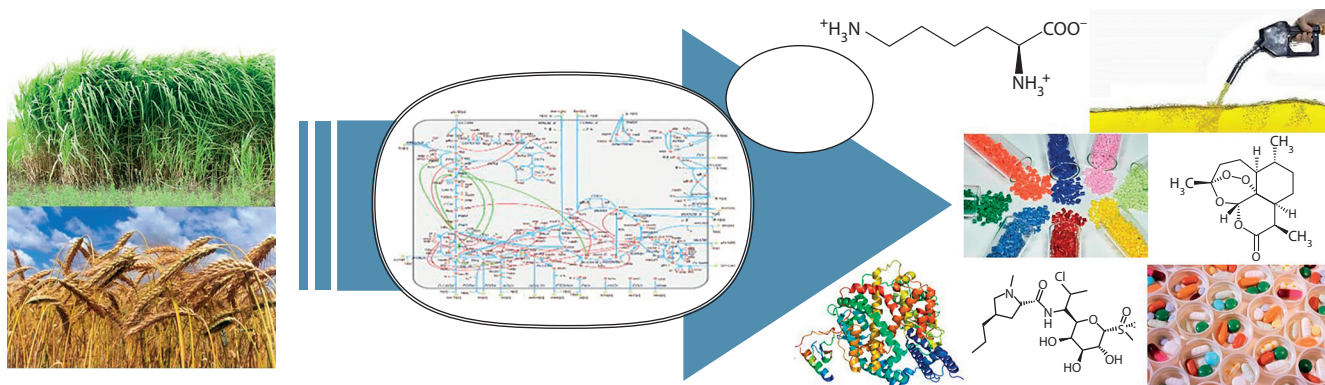


Рис. 1. Использование дрожжей для преобразования возобновляемых источников вещества и энергии.

Идея комбинирования нескольких цинковых пальцев для получения домена, способного к узнаванию целевой последовательности, появилась в конце XX века. Согласно этой идее, домен цинкового пальца может быть спроектирован так, чтобы узнавать желаемую последовательность ДНК и связываться с ней. Если к этому домену добавить нуклеазный домен, то можно получить инструмент для направленного разрезания цепи ДНК. Такие белки были предложены в 1996 г. (Kim et al., 1996). Для генерации двунитевых разрывов ДНК использовали бинарную конструкцию (Vitinaite et al., 1998). Поскольку направленное редактирование генома очень перспективно, к работе над развитием нового инструмента параллельно приступили несколько групп, которые применяли множество различных молекулярно-биологических техник для повышения точности и эффективности ZFNs (Kim et al., 1996; Durai et al., 2005; Guo et al., 2010).

На первых порах внимание было сфокусировано на получении специфических белков, содержащих цинковые пальцы (ZFPs), через бактериальный двугибридный метод с последующим соединением ZFPs с доменом нуклеазы *FokI* (Kim et al., 1996; Durai et al., 2005). Но в большинстве случаев в условиях *in vivo* ZFNs оказались не способны разрезать сайты-мишени. Тогда ученые из Китая провели исследование, направленные на разработку совместного скрининга и проверки для получения эффективных ZFP нуклеаз в дрожжах. Для этого были использованы штаммы *S. cerevisiae*, которые несут репортерные системы, позволяющие детектировать необходимую активность. Промежуточная репортерная плаزمид имеет два гомологичных плеча в 30 п. н. *Gal4* и сайт-мишень ZFN. Двойная цепь ДНК разрезалась по целевой последовательности с помощью ZFNs и восстанавливалась механизмом одноцепочечного отжига (single strand annealing – SSA). В случае удачного восстановления начиналась наработка транскрипционного фактора *Gal4*, необходимого для запуска двух ауксотрофных маркеров (Wang et al., 2013).

Однако у метода «цинковых пальцев» обнаружились серьезные недостатки: во-первых, это не вполне строгое распознавание тринуклеотидных повторов, что приводит к заметному числу нецелевых расщеплений ДНК. Во-вторых, метод оказался весьма трудозатратным и дорогостоящим, поскольку для каждой последовательности ДНК необходимо создать свою оптимизированную бел-

ковую структуру zinc-finger нуклеазы. Поэтому система «цинковые пальцы» широкого распространения не получила, и в 2010 г. научный интерес к этому объекту начал резко снижаться. Из-за сложности использования ZFNs не нашли широкого применения в генетической инженерии дрожжей, так как они не имели очевидных преимуществ в сравнении с простой рекомбинацией. Но, несмотря на это, система была опробована на дрожжах, которые выступали в роли модельных объектов.

TALENs

Более перспективным, чем ZFNs, средством избирательного воздействия на ДНК оказались конструкции на основе химерных нуклеаз, названные TALENs (transcription activator-like effector nucleases) (Sanjana et al., 2012). TALE нуклеазы – это полноценный белок TALE или его участок, объединенный с доменом, расщепляющим ДНК *FokI*-нуклеазой. Они были разработаны как высокоэффективный инструмент направленной модификации генома. Повторяющиеся домены TALE обычно состоят из 34 аминокислот, две из которых, расположенные в позициях 12 и 13, высоко вариабельные (repeat variable di-residue – RVD), и именно они отвечают за узнавание определенного нуклеотида. Идентичность этих двух остатков определяет специфичность связывания каждого TALE-повтора. Простой шифр указывает целевую базу каждого RVD (NI = A, HD = C, NG = T, NN = G или A). Также в природе были найдены TALENs, имеющие переменное число мономеров, от 1.5 до 33.5. Таким образом, каждый мономер предназначен для одного нуклеотида, и линейная последовательность мономеров в TALE определяет последовательность ДНК-мишени в направлении 5'–3' (Sanjana et al., 2012).

Природным прототипом TALENs стали белки (TAL-effectors) некоторых бактерий рода *Xanthomonas*, паразитирующих в клетках сельскохозяйственных растений. Попадая в ядро растительной клетки, эти бактериальные белки имитируют транскрипционные факторы и связываются с определенными участками ДНК, активируя таким образом гены, необходимые для выживания паразита (Sanjana et al., 2012).

С помощью искусственных нуклеаз TALENs стало возможным внести двунитевые разрывы в любой участок генома. В 2011 г. на страницах авторитетного журнала

Nature Methods методы геномной инженерии, в первую очередь использование TALENs, были названы методом года, благодаря колоссальному спектру возможных применений в самых разных областях фундаментальной и прикладной науки: от функциональной геномики и биологии развития до сельскохозяйственной биотехнологии (Joung, Sander, 2013).

С 2010 по 2013 г. велись работы по модификации эндогенных генов дрожжей, плодовой мушки, аскариды, лягушек, крыс, свиней и многих других организмов при помощи TALENs с использованием технологий и методик, ранее разработанных для ZFNs (Joung, Sander, 2013). Как и ZFNs, TALENs не нашли широкого применения в генетической инженерии дрожжей из-за трудоемкости их использования. Однако из-за простоты работы с дрожжами их применяли для развития и тестирования метода (Li et al., 2011).

Группа исследователей из Франции изучала TALENs с использованием *S. cerevisiae* в качестве модельного объекта (Richard et al., 2014). Экспансия тринуклеотидных повторов является причиной более 20 тяжелых неврологических расстройств у людей. Большое количество исследований было посвящено изучению механизмов, влияющих на экспансию многочисленных CAG/CTG повторов. В упомянутой работе TALEN применялся для распознавания и вырезания CAG/CTG тринуклеотидных повторов. В результате показано, что применение TALENs эндонуклеаз имеет 100 % эффективность в сокращении числа повторов, не вызывая какой-либо другой мутации в геноме дрожжей (Richard et al., 2014).

В работе (Li et al., 2011) описаны модульные технологии сборки заказных dTALENs и характеристики десяти таких dTALENs для направленной модификации генов. В методе использованы четыре основных повтора совместно с RVDs: NI, NG, NN и HD. Метод позволяет генерировать 48 готовых к использованию модулей, которые могут быть использованы для сборки до 23 повторяющихся единиц в любом заданном порядке. К преимуществам метода модульной сборки относятся простота, скорость и экономичность, благодаря чему этот метод может быть освоен в большинстве академических или промышленных лабораторий молекулярной биологии. Все десять dTALENs продемонстрировали эффективность нокаута и/или замены гена в тестах с тремя различными хромосомными генами *S. cerevisiae*. Данный анализ является надежным и легким индикатором активности TALEN и подтверждает, что функциональные dTALENs могут использоваться для широкого спектра геномных локусов (Li et al., 2011).

Технология обладает значительным потенциалом в области экспериментальной биологии и медицины и в широком диапазоне отраслей наук о жизни. В течение двух лет TALENs были самым востребованным методом генетической инженерии. Но с 2012 г. популярность стала набирать другая система редактирования генов – CRISPR/Cas, которая в 2015 г. окончательно заменила TALENs как метод генетической модификации.

CRISPR/Cas

Система CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats – короткие палиндромные повторы, рас-

положенные группами, равномерно удаленные друг от друга) – это естественная система адаптивного иммунитета бактерий и архей, защищающая их от проникновения чужеродной ДНК.

Специфические нуклеотидные повторы были обнаружены в 1987 г. случайно в последовательностях, фланкирующих 3'-концы *iap*-генов *E. coli* (Ishino et al., 1987). В 2002 г. R. Jansen с коллегами предложили акроним CRISPR. Ими было охарактеризовано новое семейство повторяющихся последовательностей ДНК, присутствующее у доменов бактерий и архей, но отсутствующее у эукариот и вирусов. Выявлены ассоциированные с повторами гены *cas* (CRISPR-associated), которые располагались неизменно рядом с локусом CRISPR, а также показана их взаимосвязь (Jansen et al., 2002). Структура CRISPR-кассеты представляет собой набор участков уникальной ДНК (захваченных последовательностей ДНК вирусов и плазмид) примерно одинаковой длины (обычно 32–38 п. н.), названных спейсерами. Спейсеры отделены друг от друга CRISPR-повторами, палиндромное строение которых способствует формированию вторичных структур в виде «шпилек». Размер CRISPR-повтора может варьировать от 21 до 37 п. н. (Jansen et al., 2002). Как правило, CRISPR находятся в бактериальной хромосоме, но могут быть идентифицированы и в плазмидной ДНК (Godde, Bickerton, 2006), их число может достигать 375, но обычно меньше 50 (Hogvath, Barrangou, 2010). В 2005 г. было показано, что белковые продукты расположенных рядом *cas*-генов обладают хеликазной и нуклеазной активностью (Haft et al., 2005). Дальнейшие исследования этой системы позволили установить ее роль в обеспечении защиты микроорганизмов от вторжения чужеродной ДНК (Boltin et al., 2005; Barrangou et al., 2007; Mojica et al., 2009). В 2012 г. две группы исследователей смогли направить нуклеазную активность Cas9 специфичным по последовательности образом *in vitro* (Gasiunas et al., 2012; Jinek et al., 2012). Сразу после этого в 2013 г. были опубликованы работы по применению CRISPR/Cas для инженерии генома клеток животных (Cong et al., 2013; Mali et al., 2013). С тех пор метод был оптимизирован и адаптирован для редактирования геномов разных организмов: животных, растений, насекомых, грибов, дрожжей, бактерий.

Эффективность CRISPR/Cas превзошла возможности естественной рекомбинации дрожжей, что способствовало ее активному вовлечению в разработку методов их геномного редактирования. Применение Cas9 для внесения разрывов в геном *S. cerevisiae* увеличило эффективность гомологичной рекомбинации пятикратно в присутствии одноцепочечных олигонуклеотидов в качестве матрицы, а в присутствии двуцепочечных олигонуклеотидов – 130-кратно (DiCarlo et al., 2013). Впоследствии метод CRISPR/Cas был использован для модификации других видов дрожжей (см. таблицу).

В природной системе CRISPR/Cas белок Cas9 направляется к целевому участку ДНК гибридом из двух молекул РНК – CRISPR RNA (crRNA) и tracrRNA, транскрибирующей crRNA. Вместе эти две молекулы РНК формируют вторичную структуру, которая связывается с белком Cas9. crRNA направляет систему к целевому участку генома из примерно 20 пар оснований, комплементарных фрагменту

Виды дрожжей, для которых разработаны методы направленного редактирования генома с помощью CRISPR/Cas

Название	Литературный источник
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	DiCarlo et al., 2013; Gao, Zhao, 2014; Ryan et al., 2014; Zhang et al., 2014; Bao et al., 2015; Horwitz et al., 2015; Jakočiūnas et al., 2015; Mans et al., 2015; Stovicek et al., 2015; Generoso et al., 2016; Jensen et al., 2017; Liu et al., 2017; Ng, Dean, 2017; Reider Apel et al., 2017; и др.
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Schwartz et al., 2016
<i>Kluyveromyces lactis</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i>	Horwitz et al., 2015; Nambu-Nishida et al., 2017
<i>Komagataella phaffii</i> (ранее <i>Pichia pastoris</i>)	Weninger et al., 2016
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Jacobs et al., 2014
<i>Ogataea polymorpha</i>	Numamoto et al., 2017
<i>Candida albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. lusitaniae</i>	Vyas et al., 2015; Cen et al., 2017; Norton et al., 2017
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Wang et al., 2016

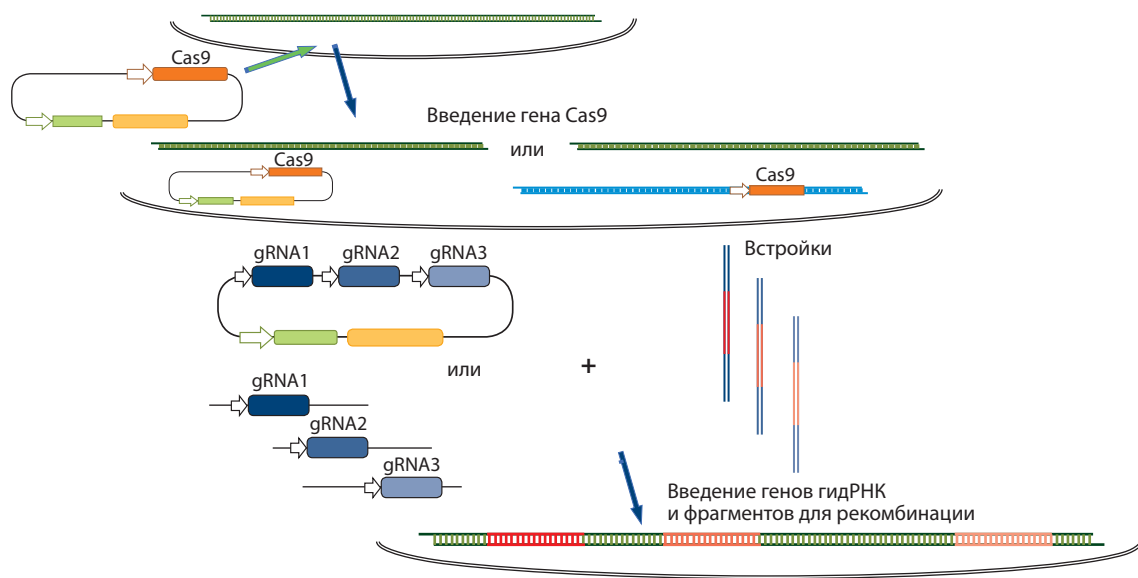


Рис. 2. Схема эксперимента по генетической инженерии дрожжей с использованием системы CRISPR/Cas.

на crRNA. За целевой последовательностью должен следовать мотив 5'-NGG-3', названный PAM (protospacer adjacent motif). ДНК разрезается за три нуклеотида до PAM последовательности (Gasiunas et al., 2012). Для большего удобства в генетической инженерии crRNA и tracrRNA были объединены в одну guiding RNA (гидРНК) через линкер (Jinek et al., 2012).

Чтобы осуществить изменения в геноме с помощью системы CRISPR, в клетке одновременно должны присутствовать белок Cas9, направляющая РНК (гидРНК), а также, если необходимо, ДНК-матрица для гомологичной рекомбинации. Наиболее часто используемый белок в генетической инженерии *S. cerevisiae* – Cas9 из *Streptococcus pyogenes*. Последовательность гена белка может быть природной (Ryan et al., 2014; Bao et al., 2015), оптимизированной для экспрессии в клетках человека (DiCarlo et al., 2013; Gao, Zhao, 2014; Zhang et al., 2014; Jakočiūnas et al., 2015; Mans et al., 2015; Stovicek et al., 2015) и дрожжей (Horwitz et al., 2015; Generoso et al., 2016). Ген белка Cas9 экспрессировали под контролем конститутивных промоторов разной силы. Наиболее часто используемый про-

мотор – TEF1 (DiCarlo et al., 2013; Zhang et al., 2014; Bao et al., 2015; Jakočiūnas et al., 2015; Mans et al., 2015; Shi et al., 2016; Jensen et al., 2017; Liu et al., 2017; Ng, Dean, 2017), второй по частоте использования промотор – ADH1 (Gao, Zhao, 2014; Jacobs et al., 2014; Fernandez, Berro, 2016; Reider Apel et al., 2017), далее следуют RNR2 (Ryan et al., 2014), FBA1 (Horwitz et al., 2015), TDH3 (Laughery et al., 2015), PGK1 (Lee et al., 2015) и др.

Чаще всего ген Cas9 вводили в клетку с использованием плазмидных векторов, низкокопийных самореплицирующихся центромерных векторов (DiCarlo et al., 2013; Zhang et al., 2014; Jakočiūnas et al., 2015; Stovicek et al., 2015) или многокопийных векторов на основе 2μ вектора (Gao, Zhao, 2014; Ryan et al., 2014; Bao et al., 2015; Horwitz et al., 2015; Laughery et al., 2015; Generoso et al., 2016). В работе (Mans et al., 2015) были описаны сконструированные штаммы *S. cerevisiae*, в которых ген Cas9 был клонирован в геном, что позволяет использовать меньше селективных маркеров, а также сократить число необходимых стадий. Схема эксперимента по генетической инженерии дрожжей приведена на рис. 2.

ГидРНК – это второй важный элемент метода CRISPR/Cas редактирования генома. Введение и правильная транскрипция гидРНК имеют наибольшее значение во всем процессе клонирования с использованием системы CRISPR/Cas. Введение в *S. cerevisiae* чаще всего проводят в составе 2μ вектора. Обычно Cas9 и гидРНК располагают в разных конструкциях, но в ряде работ их располагали в одной плазмиде (Ryan, Cate, 2014), хотя ввиду очень большого размера гена Cas9 такой вариант достаточно труден в исполнении. К тому же экспрессия Cas9 должна предшествовать трансфекции генов гидРНК (Walter et al., 2016). Использование ПЦР-фрагментов для конструирования гидРНК кассет также не получило распространения из-за большей эффективности использования плазмид (DiCarlo et al., 2013). Функциональные гидРНК получают с помощью разных конструкций, включающих промотор, терминатор и функциональные элементы для созревания РНК: 1) промотор для полимеразы III, транскрибирующий РНК с лидерной последовательностью, которая отрезается в процессе созревания (DiCarlo et al., 2013; Farzadfard et al., 2013); 2) промоторы для полимеразы III, содержащие cis-регуляторные элементы, транскрибирующие последовательность гидРНК с рибозимом, отрезающим 5'-конец (Ryan et al., 2014); 3) промотор для полимеразы II, транскрибирующий гидРНК с двумя рибозимами, отщепляющими дополнительные последовательности РНК с обоих концов (Gao, Zhao, 2014).

Эффективная работа системы гомологичной рекомбинации дрожжей позволяет параллельно вносить несколько изменений в геном с использованием CRISPR/Cas. Решающим этапом при этом является одновременная экспрессия нескольких гидРНК, для достижения чего используют несколько путей: несколько векторов с различными маркерами устойчивости (Mans et al., 2015); один вектор (Ryan et al., 2014; Jakočiūnas et al., 2015; Lee et al., 2015); трансфекция нескольких линейаризованных кассет (Horwitz et al., 2015).

Примеры использования CRISPR/Cas в работе с дрожжами

Получение сложных веществ при помощи микробной синтеза – задача, которая требует большого объема изменений в геноме. За последние годы сделано несколько подобных работ с использованием метода CRISPR/Cas. Очень интересное исследование выполнено под руководством J.D. Keasling и A. Mukhopadhyay (Reider Apel et al., 2017). Ими разработан набор инструментов для изучения метаболических путей в клетках *S. cerevisiae*, включая набор промоторов, выявлена зависимость интенсивности экспрессии от позиции на хромосомах, создан программный продукт для разработки плазмид и последовательностей для выполнения конкретных задач, направленных на оптимизацию метаболических путей. Так как для экспрессии белков в рабочем состоянии важна локализация, был получен набор лидерных последовательностей для локализации белка в разных частях клетки. Этот набор инструментов был применен для разработки промышленного штамма-продуцента таксадиена. В итоге получен штамм, способный производить таксадиен, а в результате оптимизации метаболических путей удалось

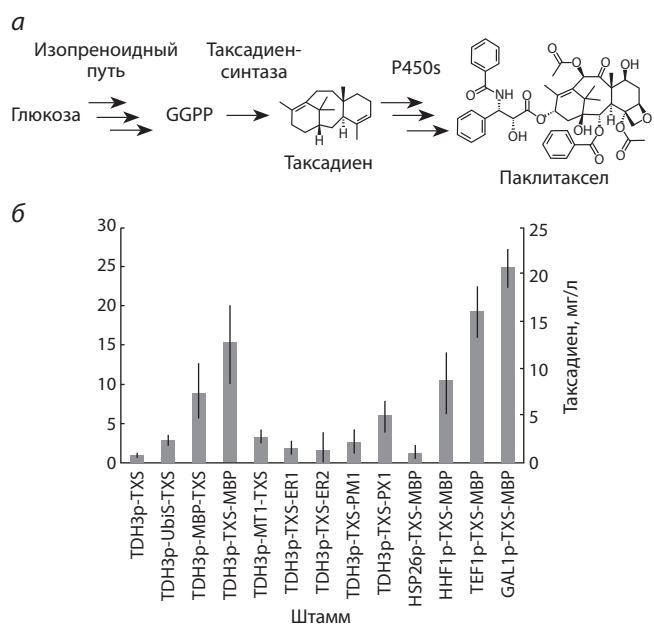


Рис. 3. а – метаболические пути биосинтеза и преобразования таксадиена в рекомбинантном штамме дрожжей *S. cerevisiae*; б – эффективность наработки таксадиена полученными в ходе выполнения работы штаммами, по: (Reider Apel et al., 2017).

увеличить его концентрацию в культуре в 25 раз (рис. 3) (Reider Apel et al., 2017). В другой работе авторы получили штамм-продуцент нарингенина, который впоследствии был оптимизирован для снижения концентрации побочного продукта (phloretic acid) (Vanegas et al., 2017).

Получение функциональных белков – еще одна задача, которая может быть эффективно решена с использованием дрожжей и требует значительного объема работ по генетической инженерии. В публикации (Sheng et al., 2017) проведена оптимизация выхода Hepatitis B Small Antigen при помощи направленного геномного редактирования *S. cerevisiae*. С одной стороны, работа не содержит оригинальных решений, основанных на моделировании и глубоком понимании процессов, с другой – она демонстрирует возможности использования технологии CRISPR/Cas для высокоэффективного редактирования генома. В ходе исследования авторы параллельно проводили нокаут нескольких генов в разных вариантах для проверки эффективности наработки целевого белка. В результате удалось повысить конечную концентрацию Hepatitis B Small Antigen (HBsAg) в 2.7 раза (Sheng et al., 2017).

Другое важное направление современной биотехнологии – это получение компонентов для крупнотоннажного химического синтеза. Так, при помощи разработанного набора инструментов для выполнения метаболической инженерии *Schizosaccharomyces pombe* с использованием CRISPR/Cas был выделен штамм-продуцент молочной кислоты (Ozaki et al., 2017). Для этого в геноме были нокаутированы шесть генов, встроены три гена и проведена оптимизация их экспрессии. Итоговый штамм позволил получить молочную кислоту в концентрации 25 г/л с выходом 0.71 г/г. Дальнейшая оптимизация может увеличить выход конечного продукта до значения, достаточного для

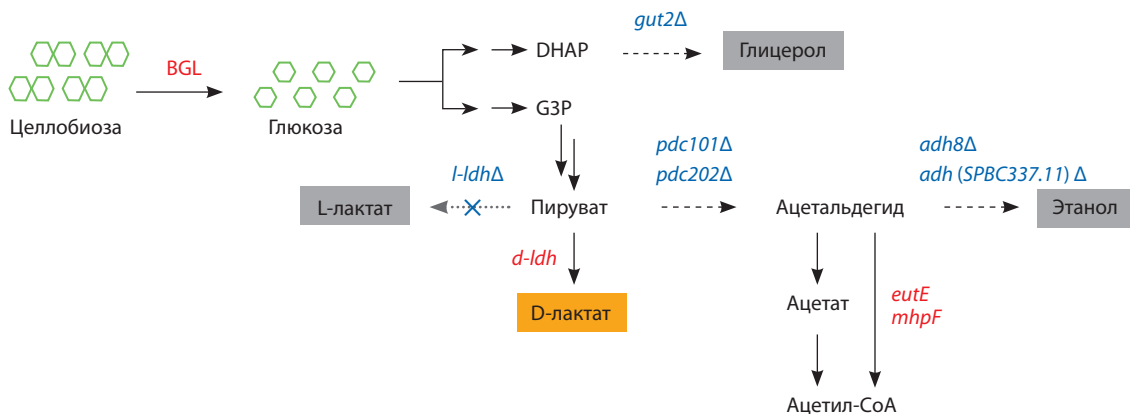


Рис. 4. Изменения, внесенные в метаболизм штамма *Schizosaccharomyces pombe* для создания штамма-производителя молочной кислоты, по: (Ozaki et al., 2017).

Красным отмечены гены, которые были клонированы в геном, синим – гены, которые были нокаутированы.

организации технологического процесса (Ozaki et al., 2017). Изменения, которые были внесены в ходе выполнения работы, представлены на рис. 4. В исследовании (Shi et al., 2016) был получен штамм-производитель (R,R)-2,3-бутандиола, способный к коферментации глюкозы и ксилозы, а также проведено многократное клонирование 24 кб фрагмента, несущего необходимые последовательности.

Аргонавт

Уже на протяжении шести лет система CRISPR/Cas доминирует в качестве инструмента для геномного редактирования эукариот, ее использование весьма эффективно и достаточно просто. Несмотря на это, в мире продолжается поиск других инструментов, которые были бы более удобны или просты в использовании. В 2016 г. опубликовано сообщение об обнаружении белка Аргонавт (Gao et al., 2016), который может существенно дополнить возможности методов геномного редактирования. Подобный белок мог бы оказаться особенно эффективным при работе с одноклеточными организмами или в клеточных культурах. К сожалению, активность белка не подтверждена независимыми исследованиями других лабораторий (Burgess et al., 2016; Javidi-Parsijani et al., 2017; Khin et al., 2017).

Белок Аргонавт впервые упоминается в работе, описывающей мутацию *Arabidopsis thaliana*. Свое название ген и соответствующий белок получили по латинскому названию осьминога *Argonauta argo* – листья мутантного растения свернулись, как щупальца у кальмара (Bohmert et al., 1998). Позднее выяснили, что Аргонавт – это белок, играющий ключевую роль в эукариотической РНК-интерференции. При интерференции Аргонавт использует короткие 5'-фосфорилированные РНК для нацеливания на мРНК. Белки Аргонавт относятся к суперсемейству PIWI (Swarts et al., 2014).

Большое количество генов прокариот также содержат гены белка Аргонавт (Cerutti et al., 2000; Shabalina, Koonin, 2008; Makarova et al., 2009). В работе (Vogel, 2014) показано, что роль этих белков в клетках прокариот заключается в защите от чужеродной ДНК, попадающей в клетку.

Белки Аргонавт обладают различной специфичностью: часть белков образует комплексы с 5'-фосфорилированными олиго-РНК, другая – с 5'-фосфорилированными олиго-ДНК. Первыми описанными белками Аргонавт прокариот были белки термофильных микроорганизмов, для которых показана способность к внесению разрывов в ДНК *in vitro*. Это были белки из *Thermus thermophilus* (Swarts et al., 2015b) и *Pyrococcus furiosus* (Swarts et al., 2015a). Белки осуществляли защиту клетки от проникновения чужеродной ДНК и проявляли способность к направленному разрушению плазмидных векторов строго в местах, комплементарных направляющим 5'-фосфорилированным ДНК-олигонуклеотидам. В частности, широко используемый в молекулярной биологии для изучения генома термофильных бактерий штамм *Thermus thermophilus* HB27, легко подвергающийся трансфекции, несет поврежденный ген белка Аргонавт (Swarts et al., 2015b). Изучение свойств найденных белков выявило их способность к связыванию с 5'-фосфорилированными олигонуклеотидами и направленному внесению разрывов в нуклеотидную последовательность.

Способность белков Аргонавт к внесению разрывов в полинуклеотидные последовательности по строго определенным сайтам, комплементарным направляющим 5'-фосфорилированным ДНК-олигонуклеотидам (гидДНК), заинтересовала исследователей как новая возможность для создания систем направленного редактирования генома. Однако белки термофильных организмов оказались непригодны для внесения изменений в клетки мезофильных организмов, так как для их работы требовалась температура более 65 °С, что неприемлемо – клетки животных, растений и большинства микроорганизмов не выживают в таких условиях.

В сравнении с CRISPR/Cas, система на основе белка Аргонавт может обладать рядом преимуществ, особенно для одноклеточных организмов, таких как дрожжи. Ключевыми для системы модификации являются всего два элемента: сам белок и направляющий 5'-фосфорилированный олигонуклеотид. Направляющая гидДНК для белков Аргонавт значительно проще в сравнении с гидРНК для Cas9. Размер известных белков Аргонавт со-

ставляет 2/3 от размеров белка Cas9, что важно в связи с тем, что у Cas9 очень большой размер и его ген неудобен в работе.

Однако в настоящее время вопрос о возможности использования белка Аргонавт для редактирования генома эукариот вновь оказался открытым. Описание фермента Аргонавт, способного работать в физиологических для животных температурах, естественно, заинтересовало научное сообщество. Сразу несколько групп начали разрабатывать методы геномного редактирования с использованием нового фермента. Неожиданностью стало то, что ни одной группе исследователей не удалось показать его активность (Burgess et al., 2016; Javid-Parsijani et al., 2017; Khin et al., 2017).

Заключение

Инженерия генома дрожжей имеет длинную и успешную историю благодаря наличию собственных механизмов гомологичной рекомбинации. С одной стороны, дрожжи *S. cerevisiae* долгое время были основным модельным объектом при изучении эукариот, что объяснялось относительной простотой устройства и методов культивирования. С другой стороны, это замечательная платформа для получения штаммов для биотехнологического применения. Дрожжи служили моделью и вспомогательным инструментом при разработке технически сложных методов для модификации генома животных и растений, а также были целью работ. В настоящее время наиболее процессивные инструменты для направленного геномного редактирования разработаны именно для дрожжей. В первую очередь это параллельное введение мутаций при помощи CRISPR/Cas, которое реализовано уже сегодня. В обзоре приведены примеры успешного использования этого метода и описаны существующие инструменты.

Поскольку методы генетической инженерии одноклеточных организмов несколько отличаются от принципов работы с многоклеточными, возможно появление новых инструментов, специализирующихся именно на работе с ними. Одним из таких вариантов мог бы стать белок Аргонавт. К сожалению, в настоящее время достоверно показана активность только высокотемпературных вариантов этого белка.

Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России (договор 02.G25.31.0172 от 01.12.2015).

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

Bao Z., Xiao H., Liang J., Zhang L., Xiong X., Sun N., Si T., Zhao H. Homology-integrated CRISPR-Cas (HI-CRISPR) system for one-step multigene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. ACS Synth. Biol. 2015;4:585-594. DOI 10.1021/sb500255k.

Barrangou R., Fremaux C., Deveau H., Richards M., Boyaval P., Moineau S., Romero D.A., Horvath P. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. Science. 2007;315(5819):1709-1712. DOI 10.1126/science.1138140.

Bitinaite J., Wah D.A., Aggarwal A.K., Schildkraut I. FokI dimerization is required for DNA cleavage. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.

1998;95:10570-10575. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC27935/>.

Bohmer K., Camus I., Bellini C., Bouchez D., Caboche M., Benning C. *AGO1* defines a novel locus of *Arabidopsis* controlling leaf development. EMBO J. 1998;17(1):170-180. DOI 10.1093/emboj/17.1.170.

Bolotin A., Quinquis B., Sorokin A., Ehrlich S.D. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. Microbiology. 2005;151(8):2551-2561. DOI 10.1099/mic.0.28048-0.

Botstein D., Chervitz S.A., Cherry M.J. Yeast as a model organism. Science. 1997;277(5330):1259-1260. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3039837/>.

Burgess S., Cheng L., Gu F., Huang J., Huang Z., Lin S., Li J., Li W., Qin W., Sun Y., Songyang Z., Wei W., Wu Q., Wang H., Wang X., Xiong J.W., Xi J., Yang H., Zhou B., Zhang B. Questions about NgAgo. Protein Cell. 2016;7(12):913-915. DOI 10.1007/s13238-016-0343-9.

Cen Y., Timmermans B., Souffriau B., Thevelein J.M., Van Dijck P. Comparison of genome engineering using the CRISPR-Cas9 system in *C. glabrata* wild type and *lig4* strains. Fungal Genet. Biol. 2017;107:44-50. DOI 10.1016/j.fgb.2017.08.004.

Cerutti L., Mian N., Bateman A. Domains in gene silencing and cell differentiation proteins: the novel PAZ domain and redefinition of the Piwi domain. Trends Biochem. Sci. 2000;25:481-482. DOI 10.1016/S0968-0004(00)01641-8.

Cong L., Ran F.A., Cox D., Lin S., Barretto R., Habib N., Hsu P.D., Wu X., Jiang W., Marraffini L.A., Zhang F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. Science. 2013;339(6121):819-823. DOI 10.1126/science.1231143.

DiCarlo J.E., Norville J.E., Mali P., Rios X., Aach J., Church G.M. Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems. Nucleic Acids Res. 2013;41(7):4336-4343. DOI 10.1093/nar/gkt135.

Durai S., Mani M., Kandavelou K., Wu J., Porteus M.H., Chandrasegaran S. Zinc finger nucleases: custom-designed molecular scissors for genome engineering of plant and mammalian cells. Nucleic Acids Res. 2005;33:5978-5990. DOI 10.1093/nar/gki912.

Farzadfard F., Perli S.D., Lu T.K. Tunable and multifunctional eukaryotic transcription factors based on CRISPR/Cas. ACS Synth. Biol. 2013;2:604-613. DOI 10.1021/sb400081r.

Fernandez R., Berro J. Use of a fluoride channel as a new selection marker for fission yeast plasmids and application to fast genome editing with CRISPR/Cas9. Yeast. 2016;33:549-557. DOI 10.1002/yea.3178.

Gao F., Shen X.Z., Jiang F., Wu Y., Han Ch. DNA-guided genome editing using the *Natronobacterium gregoryi* Argonaute. Nat. Biotechnol. 2016;34(7):768-773. DOI 10.1038/nbt.3547.

Gao Y., Zhao Y. Self-processing of ribozyme-flanked RNAs into guide RNAs *in vitro* and *in vivo* for CRISPR-mediated genome editing. J. Integr. Plant Biol. 2014;56:343-349. DOI 10.1111/jipb.12152.

Gasiunas G., Barrangou R., Horvath P., Siksnys V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2012;109:E2579-E2586. DOI 10.1073/pnas.1208507109.

Generoso W.C., Gottardi M., Oreb M., Boles E. Simplified CRISPR-Cas genome editing for *Saccharomyces cerevisiae*. J. Microbiol. Methods. 2016;127:203-205. doi.org/10.1016/j.mimet.2016.06.020.

Godde J.S., Bickerton A. The repetitive DNA elements called CRISPRs and their associated genes: evidence of horizontal transfer among prokaryotes. J. Mol. Evol. 2006;62(6):718-729. DOI 10.1007/s00239-005-0223-z.

Guo J., Gaj T., Barbas C.F. Directed evolution of an enhanced and highly efficient FokI cleavage domain for zinc finger nucleases. J. Mol. Biol. 2010;400(1):96-107. DOI 10.1016/j.jmb.2010.04.060.

Haft D.H., Selengut J., Mongodin E.F., Nelson K.E. A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes. PLoS Comput. Biol. 2005;1(6):E60. DOI 10.1371/journal.pcbi.0010060.

- Horvath P., Barrangou R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science*. 2010;327(5962):167-170. DOI 10.1126/science.1179555.
- Horwitz A.A., Walter J.M., Schubert M.G., Kung S.H., Hawkins K., Platt D.M., Hernday A.D., Mahatdejkul-Meadows T., Szeto W., Chandran S.S., Newman J.D. Efficient multiplexed integration of synergistic alleles and metabolic pathways in yeasts via CRISPR-Cas. *Cell Systems*. 2015;1(1):88-96. doi.org/10.1016/j.cels.2015.02.001.
- Ishino Y., Shinagawa H., Makino K., Amemura M., Nakata A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J. Bacteriol.* 1987;169(12):5429-5433. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC213968/>.
- Jacobs J.Z., Ciccaglione K.M., Tournier V., Zariatigui M. Implementation of the CRISPR-Cas9 system in fission yeast. *Nat. Commun.* 2014;5:5344. DOI 10.1038/ncomms6344.
- Jakočiūnas T., Bonde I., Herrgård M., Harrison S.J., Kristensen M., Pedersen L.E., Jensen M.K., Keasling J.D. Multiplex metabolic pathway engineering using CRISPR/Cas9 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab. Eng.* 2015;28:213-222. DOI 10.1016/j.ymben.2015.01.008.
- Jansen R., Embden J.D., Gaastra W., Schouls L.M. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol. Microbiol.* 2002;43(6):1565-1575. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11952905>.
- Javidi-Parsijani P., Niu G., Davis M., Lu P., Atala A., Lu B. No evidence of genome editing activity from *Natronobacterium gregoryi* Argonaute (NgAgo) in human cell. *PLoS ONE*. 2017;12(5):e0177444. DOI 10.1371/journal.pone.0177444.
- Jensen E.D., Ferreira R., Jakočiūnas T., Arsovska D., Zhang J., Ding L., Smith J.D., David F., Nielsen J., Jensen M.K., Keasling J.D. Transcriptional reprogramming in yeast using dCas9 and combinatorial gRNA strategies. *Microb. Cell Fact.* 2017;16(1):46. DOI 10.1186/s12934-017-0664-2.
- Jensen M.K., Keasling J.D. Recent applications of synthetic biology tools for yeast metabolic engineering. *FEMS Yeast Res.* 2015;15(1):1-10. DOI 10.1111/1567-1364.12185.
- Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 2012;337(6096):816-821. DOI 10.1126/science.1225829.
- Joung J.K., Sander J.D. TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2013;14(1):49-55. DOI 10.1038/nrm3486.
- Khin N.C., Lowe J.L., Jensen L.M., Burgio G. No evidence for genome editing in mouse zygotes and HEK293T human cell line using the DNA-guided *Natronobacterium gregoryi* Argonaute (NgAgo). *PLoS ONE*. 2017;12(6):e0178768. DOI 10.1371/journal.pone.0178768.
- Kim Y.G., Cha J., Chandrasegaran S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1996;93:1156-1160. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC40048/>.
- Kuijpers N.G., Solis-Escalante D., Bosman L., van den Broek M., Pronk J.T., Daran J.-M., Daran-Lapujade P. A versatile, efficient strategy for assembly of multi-fragment expression vectors in *Saccharomyces cerevisiae* using 60 bp synthetic recombination sequences. *Microb. Cell Fact.* 2013;12(1):47. DOI 10.1186/1475-2859-12-47.
- Laughery M.F., Hunter T., Brown A., Hoopes J., Ostbye T., Shumaker T., Wyrick J.J. New vectors for simple and streamlined CRISPR-Cas9 genome editing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 2015;32:711-720. DOI 10.1002/yea.3098.
- Lechner A., Brunk E., Keasling J.D. The need for integrated approaches in metabolic engineering. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2016;8(11):a023903. DOI 10.1101/cshperspect.a023903.
- Lee M.E., DeLoache W.C., Cervantes B., Dueber J.E. A highly characterized yeast toolkit for modular, multipart assembly. *ACS Synth. Biol.* 2015;4:975-986. DOI 10.1021/sb500366v.
- Li T., Huang Sh., Zhao X., Wright D.A., Carpenter S., Spalding M.H., Weeks D.P., Yang B. Modularly assembled designer TAL effector nucleases for targeted gene knockout and gene replacement in eukaryotes. *Nucleic Acids Res.* 2011;39(14):6315-6325. DOI 10.1093/nar/gkr188.
- Liu Z., Liang Y., Ang E.L., Zhao H. A new era of genome integration – simply cut and paste! *ACS Synth. Biol.* 2017;6(4):601-609. DOI 10.1021/acssynbio.6b00331.
- Makarova K.S., Wolf Y.I., Van der Oost J., Koonin E.V. Prokaryotic homologs of Argonaute proteins are predicted to function as key components of a novel system of defense against mobile genetic elements. *Biol. Direct.* 2009;4:29. DOI 10.1186/1745-6150-4-29.
- Mali P., Yang L., Esvelt K.M., Aach J., Guell M., DiCarlo J.E., Norville J.E., Church G.M. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*. 2013;339:823-826. DOI 10.1126/science.1232033.
- Mans R., van Rossum H.M., Wijsman M., Backx A., Kuijpers N.G., van den Broek M., Daran-Lapujade P., Pronk J.T., van Maris A.J., Daran J.M. CRISPR/Cas9: a molecular Swiss army knife for simultaneous introduction of multiple genetic modifications in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 2015;15(2):Fov004. DOI 10.1093/femsyr/fov004.
- Mojica F.J., Díez-Villaseñor C., García-Martínez J., Almendros C. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology*. 2009;155(3):733-740. DOI 10.1099/mic.0.023960-0.
- Nambu-Nishida Y., Nishida K., Hasunuma T., Kondo A. Development of a comprehensive set of tools for genome engineering in a cold- and thermo-tolerant *Kluyveromyces marxianus* yeast strain. *Sci. Rep.* 2017;7(1):8993. DOI 10.1038/s41598-017-08356-5.
- Ng H., Dean N. Dramatic improvement of CRISPR/Cas9 editing in *Candida albicans* by increased single guide RNA expression. *mSphere*. 2017;2(2):e00385-16. DOI 10.1128/mSphere.00385-16.
- Nielsen J., Larsson C., van Maris A., Pronk J. Metabolic engineering of yeast for production of fuels and chemicals. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2013;24(3):398-404. DOI 10.1016/j.copbio.2013.03.023.
- Norton E.L., Sherwood R.K., Bennett R.J. Development of a CRISPR-Cas9 system for efficient genome editing of *Candida lusitanae*. *mSphere*. 2017;2(3):e00217-17. DOI 10.1128/mSphere.00217-17.
- Numamoto M., Maekawa H., Kaneko Y. Efficient genome editing by CRISPR/Cas9 with a tRNA-sgRNA fusion in the methylotrophic yeast *Ogataea polymorpha*. *J. Biosci. Bioeng.* 2017;124(5):487-492. DOI 10.1016/j.jbiosc.2017.06.001.
- Ostrov N., Landon M., Guell M., Kuznetsov G., Teramoto J., Cervantes N., Zhou M., Singh K., Napolitano M.G., Moosburner M., Shrock E., Pruitt B.W., Conway N., Goodman D.B., Gardner C.L., Tyree G., Gonzales A., Wanner B.L., Norville J.E., Lajoie M.J., Church G.M. Design, synthesis, and testing toward a 57-codon genome. *Science*. 2016;353(6301):819-822. DOI 10.1126/science.aaf3639.
- Ozaki A., Konishi R., Otomo C., Kishida M., Takayama S., Matsu-moto T., Tanaka T., Kondo A. Metabolic engineering of *Schizosaccharomyces pombe* via CRISPR-Cas9 genome editing for lactic acid production from glucose and cellobiose. *Metab. Eng. Commun.* 2017;5:60-67. DOI 10.1016/j.meteno.2017.08.002.
- Paddon C.J., Westfall P.J., Pitera D.J., Benjamin K., Fisher K., McPhee D., Leavell M.D., Tai A., Main A., Eng D., Polichuk D.R., Teoh K.H., Reed D.W., Treyner T., Lenihan J., Jiang H., Fleck M., Bajad S., Dang G., Dengrove D., Diola D., Dorin G., Ellens K.W., Fickes S., Galazzo J., Gaucher S.P., Geistlinger T., Henry R., Hepp M., Horning T., Iqbal T., Kizer L., Lieu B., Melis D., Moss N., Regentin R., Secrest 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.D. High-level semi-synthetic production of the potent antimalarial artemisinin. *Nature*. 2013;496(7446):528-532. DOI 10.1038/nature12051.
- Reider Apel A., d'Espaux L., Wehrs M., Sachs D., Li R.A., Tong G.J., Garber M., Nnadi O., Zhuang W., Hillson N.J., Keasling J.D., Mukhopadhyay A. A Cas9-based toolkit to program gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(1):496-508. DOI 10.1093/nar/gkw1023.

- Richard G.-F., Viterbo D., Khanna V., Mosbach V., Castelain L., Dujon B. Highly specific contractions of a single CAG/CTG trinucleotide repeat by TALEN in yeast. *PLoS ONE*. 2014;9(4):e95611. DOI 10.1371/journal.pone.0095611.
- Ryan O.W., Cate J.H. Multiplex engineering of industrial yeast genomes using CRISPRm. *Methods Enzymol.* 2014;546:473-489. DOI 10.1016/B978-0-12-801185-0.00023-4.
- Ryan O.W., Skerker J.M., Maurer M.J., Li X., Tsai J.C., Poddar S., Lee M.E., DeLoache W., Dueber J.E., Arkin A.P., Cate J.H.D. Selection of chromosomal DNA libraries using a multiplex CRISPR system. *eLife*. 2014;3:e03703. DOI 10.7554/eLife.03703.
- Sanjana N.E., Cong L., Zhou Y., Cunniff M.M., Feng G., Zhang F. A transcription activator-like effector toolbox for genome engineering. *Nat. Protocols*. 2012;7(1):171-192. DOI 10.1038/nprot.2011.431.
- Schwartz C.M., Hussain M.S., Blenner M., Wheelodon I. Synthetic RNA polymerase III promoters facilitate high-efficiency CRISPR-Cas9-mediated genome editing in *Yarrowia lipolytica*. *ACS Synth. Biol.* 2016;5(4):356-359. DOI 10.1021/acssynbio.5b00162.
- Shabalina S.A., Koonin E.V. Origins and evolution of eukaryotic RNA interference. *Trends Ecol. Evol.* 2008;23:578-587. DOI 10.1016/j.tree.2008.06.005.
- Sheng J., Flick H., Feng X. Systematic optimization of protein secretory pathways in *Saccharomyces cerevisiae* to increase expression of Hepatitis B Small Antigen. *Front. Microbiol.* 2017;8:875. DOI 10.3389/fmicb.2017.00875.
- Shi S., Liang Y., Zhang M.M., Ang E.L., Zhao H. A highly efficient single-step, markerless strategy for multi-copy chromosomal integration of large biochemical pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab. Eng.* 2016;33:19-27. DOI 10.1016/j.ymben.2015.10.011.
- Stovicek V., Borodina I., Forster J. CRISPR-Cas system enables fast and simple genome editing of industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Metab. Eng. Commun.* 2015;2:13-22. doi.org/10.1016/j.meteno.2015.03.001.
- Swarts D.C., Hegge J.W., Hinojo I., Shiimori M., Ellis M.A., Dumrongkulraksa J., Terns R.M., Terns M.P., van der Oost J. Argonaute of the archaeon *Pyrococcus furiosus* is a DNA-guided nuclease that targets cognate DNA. *Nucleic Acids Res.* 2015a;43(10):5120-5129. DOI 10.1093/nar/gkv415.
- Swarts D.C., Koehorst J.J., Westra E.R., Schaap P.J., van der Oost J. Effects of Argonaute on gene expression in *Thermus thermophilus*. *PLoS ONE*. 2015b;10(4):e0124880. DOI 10.1371/journal.pone.0124880.
- Swarts D.C., Makarova K., Wang Y., Nakanishi K., Ketting R.F., Koonin E.V., Patel D.J., van der Oost J. The evolutionary journey of Argonaute proteins. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2014;21(9):743-753. DOI 10.1038/nsmb.2879.
- Vanegas K.G., Lehka B.J., Mortensen U.H. SWITCH: a dynamic CRISPR tool for genome engineering and metabolic pathway control for cell factory construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb. Cell Fact.* 2017;16(1):25. DOI 10.1186/s12934-017-0632-x.
- Vogel J. A bacterial seek-and-destroy system for foreign DNA. *Science*. 2014;344:972-973. DOI 10.1126/science.1252962.
- Vyas V.K., Barrasa M.I., Fink G.R. A *Candida albicans* CRISPR system permits genetic engineering of essential genes and gene families. *Sci. Adv.* 2015;1(3):e1500248. DOI 10.1126/sciadv.1500248.
- Walter J.M., Chandran S.S., Horwitz A.A. CRISPR-cas-assisted multiplexing (CAM): simple same-day multi-locus engineering in yeast. *J. Cell Physiol.* 2016;231:2563-2569. DOI 10.1002/jcp.25375.
- Wang L., Lin J., Zhang T., Xu K., Ren Ch., Zhang Zh. Simultaneous screening and validation of effective zinc finger nucleases in yeast. *PLoS ONE*. 2013;8(5):e64687. DOI 10.1371/journal.pone.0064687.
- Wang Y., Wei D., Zhu X., Pan J., Zhang P., Huo L., Zhu X. A 'suicide' CRISPR-Cas9 system to promote gene deletion and restoration by electroporation in *Cryptococcus neoformans*. *Sci. Rep.* 2016;6:31145. DOI 10.1038/srep31145.
- Weninger A., Hatzl A.-M., Schmid C., Vogl T., Glieder A. Combinatorial optimization of CRISPR/Cas9 expression enables precision genome engineering in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *J. Biotechnol.* 2016;235:139-149. DOI 10.1016/j.jbiotec.2016.03.027.
- Wriessnegger T., Pichler H. Yeast metabolic engineering—targeting sterol metabolism and terpenoid formation. *Progr. Lipid Res.* 2013;52(3):277-293. DOI 10.1016/j.plipres.2013.03.001.
- Zhang G.C., Kong I.I., Kim H., Liu J.J., Cate J.H., Jin Y.S. Construction of a quadruple auxotrophic mutant of an industrial polyploidy *Saccharomyces cerevisiae* using RNA-guided Cas9 nuclease. *Appl. Environ. Microb.* 2014;80:7694-7701. DOI 10.1128/AEM.02310-14.