

РАЗРАБОТКА CRISPR-CAS9 СИСТЕМЫ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА ДРОЖЖЕЙ YARROWIA LIPOLYTICA НА ПРИМЕРЕ СИНТЕЗА В-КАРОТИНА

М.О. Таратынова, Е.Ю. Юзбашева, Ю.М. Косихина, С.П. Синецкий

Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов НИЦ «Курчатовский институт, Москва, Россия

Аскомицетовые дрожжи *Yarrowia lipolytica* могут быть использованы для производства химических веществ класса терпенов, в частности β-каротина. Сам β-каротин применяется главным образом в пищевой и кормовой промышленности.

Создание стабильных производственных штаммов требует повышения уровня экспрессии генов, кодирующих ферменты, которые участвуют в синтезе заданного продукта. Однако, традиционный метод редактирования генома предполагает встраивание экспрессионной кассеты совместно с маркером. Перед вторым раундом встраивания новой генетической кассеты необходимо удалить генетический маркер используя сайт-специфическую рекомбинацию с помощью системы Cre-Lox, что является долгим и трудоемким процессом. Более того, дрожжи *Y. lipolytica* характеризуются высокой эффективностью негомологичной рекомбинации и относительно низкой эффективностью гомологичной рекомбинации, что значительно затрудняет встраивание генетической конструкции в заданный локус генома.

В настоящее время набирает популярность технология редактирования генома с помощью системы CRISPR-Cas9, которая позволяет осуществить интеграцию генов в заданный локус генома без интеграции селективных маркеров. CRISPR-ассоциированный белок Cas9 является эндонуклеазой, которая связывается с единой направляющей РНК (sgRNA), состоящей в свою очередь из направляющей CRISPR-РНК (crRNA) и транс-кодируемой CRISPR-РНК (tracrRNA) (1). 20 нуклеотидов 5' концевой последовательности crRNA определяет сайт-мишень на ДНК по принципу комплементарности. Эта ДНК-мишень описывается формулой 5' – N20-NGG-3', где N обозначает любой нуклеотид, а NGG – смежный мотив протоспейсера (PAM). Сначала Cas9 распознаёт PAM, а после этого прилегающая ДНК проверяется на комплементарность crRNA. Затем в результате Cas9-sgRNA опосредованного разрезания ДНК-мишени образуется двухцепочечный разрыв. В результате репарации такого разрыва путем негомологичной рекомбинации с высокой частотой возникают ошибки (делеции или инсерции пар нуклеотидов), что может приводить к инактивации гена. Для репарации двунитевого разрыва путем гомологичной рекомбинации необходимо также введение генетической кассеты, содержащей участки гомологии к заданному локусу. Данная генетическая кассета может содержать гомологичные или гетерологичные гены которые будут интегрированы в выбранный локус на хромосоме.

Таким образом, целью данной работы является разработка CRISPR-Cas9 системы редактирования генома дрожжей *Y. lipolytica* на примере конструирования гетерологичного пути синтеза β-каротина. Исходя из обзора литературы и анализа генома *in silico* были выбраны локусы для интеграции (Int) в геном *Y. lipolytica*, не содержащие кодирующих генов. В данной работе нами был собран путь биосинтеза β-каротина в дрожжах *Y. lipolytica* в следующей последовательности: 1) гетерологичные гены, кодирующие бифункциональные ферменты фитоенсинтазу и ликопинсинтазу (carRP) и фитоендегидрогеназу (carB) из *Mucor circinelloides* (2), а так же ген *Y. lipolytica* GGS1, кодирующий геранилгеранил дифосфат синтазу, которые совместно приводят к синтезу геранилгеранилдифосфата, фитоена, ликопина и β-каротина; 2) ген *Y. lipolytica* HMGR1, кодирующий гидроксиметилглутарил-КоА-редуктазу, синтезирующую мевалонат; 3) ген *Y. lipolytica* ERG20, кодирующий геранил / фарнезилдифосфатсинтазу, участвующую в синтезе фарнезилдифосфата; 4) ERG12, кодирующий мевалонаткиназу, фосфорилирующую мевалонат. Для интеграции выбранных генов были сконструированы эписомальные плазмиды, содержащие целевые гены с промоторами и терминаторами, экранированные гомологичными хромосомальными областями к заданным локусам, а также ген устойчивости к антибиотику гигромицину (hph). Каждая экспрессионная кассета была сконструирована таким образом, чтобы целевые гены были интегрированы в два различных локуса (Рис. 1). С помощью программы ChopChop (3) были выбраны по две нуклеотидных последовательности ДНК мишени в заданных локусах генома *Y. lipolytica*. Были сконструированы эписомальные плазмиды pCNR-sgInt (по две для каждого локуса), содержащие ген, кодирующий эндонуклеазу Cas9, нуклеотидную последовательность, кодирующую направляющую sgRNA к локусам Int, а также ген устойчивости к антибиотику нурсеотрицину (Nat).

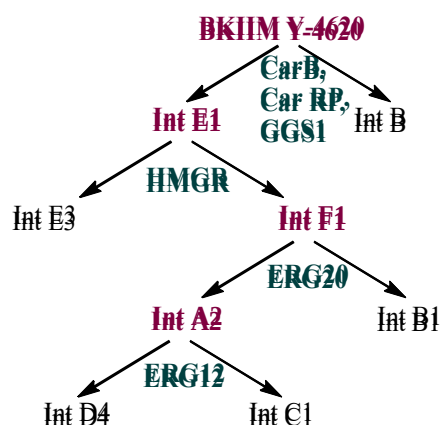


Рисунок 1. Этапы конструирования пути синтеза β -каротина в дрожжах *Y. lipolytica* при использовании CRISPR-Cas9 опосредованной системы интеграции целевых генов в локусы Int

На первом этапе осуществляли ко-трансформацию генетической кассеты, содержащей гены CarB, CarRP, GGS1, и эписомальной плазмиды pCNR-sgInt в штамм BKIM Y-4620, накапливающий нейтральные липиды до 50 % от сухого веса и способный утилизировать сахарозу в качестве источника углерода. Генетическую кассету CarB-CarRP-GGS1 использовали как в виде эписомальной плазмиды, так и в виде линейаризованного фрагмента. Использование CarB-CarRP-GGS1 кассеты в виде эписомальной плазмиды не привело к появлению трансформантов оранжевого цвета, в отличие от линейаризованного фрагмента, где около 80 % полученных трансформантов характеризовались ярко-оранжевым цветом колоний. Таким образом, в дрожжах *Y. lipolytica* для репарации двунитевого разрыва, вызванного Cas9-sgRNA опосредованным разрезанием ДНК-мишени, необходимо введение генетической кассеты с гомологичными фланками в виде линейаризованного фрагмента.

Интересно отметить, что эффективность интеграции при использовании разных sgRNA для одного и того же локуса могла сильно отличаться. Например, при встраивании

генетической кассеты в локус IntF1 наблюдалась эффективность 100 % для двух выбранных sgRNA, при интеграции в локус IntC1 – 100 % и 17 % для двух разных sgRNA, соответственно, а встраивание генетической кассеты в локус IntA2 с использованием одного варианта sgRNA не прошло совсем, а для другого варианта эффективность составила 40 %.

Культивирование рекомбинантных штаммов проводилось в пробирках с общим объемом 50 мл и рабочим объемом 5 мл в богатой среде YPSuc9, содержащей 90 г./л сахарозы. Штамм, содержащий CarB-CarRP-GGS1 кассету, интегрированную в локус IntB, характеризовался снижением скорости роста по сравнению со штаммом, содержащим данную кассету в локусе IntE1. Поэтому для дальнейшей работы был выбран штамм BKIM Y-4620 IntE1: CarB-CarRP-GGS, который накапливал 7,9 мг/г сухого веса β -каротина. Наибольший эффект на продукцию β -каротина оказало повышение уровня экспрессии гена HMGR1 при его интеграции в локус IntF1 (накопление β -каротина увеличилось на 16 % по сравнению с родительским штаммом), тогда как интеграция гена HMGR1 в локус IntE3 повысила продукцию β -каротина только на 9 %. Интеграция гена ERG20 в локусы IntA2 и IntB1 повысила уровень накопления β -каротина на 23 % и 12 %, соответственно, относительно штамма BKIM Y-4620 IntE1: CarB-CarRP-GGS. Повышение уровня экспрессии гена ERG12 посредством его интеграции в локусы IntD4 и IntC1 не повлияло на продукцию β -каротина.

Таким образом в ходе проделанной работы была разработана CRISPR-Cas9 система редактирования генома дрожжей *Y. lipolytica* и сконструирован штамм BKIM Y-4620 IntE1: CarB-CarRP-GGS IntF1:HMGR1 IntA2:ERG20, продуцирующий 9,7 мг/г сухого веса (214 мг/л) β -каротина.

Работа выполнена при финансовой поддержке государства (Государственное задание № 595–00003–19 ПП) с использованием УНУ – Национальный биоресурсный центр «Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов» НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика.

ЛИТЕРАТУРА

- Schwartz C. et al. Standardized markerless gene integration for pathway engineering in *Yarrowia lipolytica* //ACS synthetic biology. – 2016. – Т. 6. – №. 3. – С. 402–409.
- Gao S. et al. Iterative integration of multiple-copy pathway genes in *Yarrowia lipolytica* for heterologous β -carotene production //Metabolic engineering. – 2017. – Т. 41. – С. 192–201.
- <https://chopchop.cbu.uib.no>