

CRISPR/CAS9 КАК АЛЬТЕРНАТИВА КОНТРСЕЛЕКЦИИ ПО *URA3* ДЛЯ ПРИЦЕЛЬНОЙ ИНТЕГРАЦИИ ДНК В ГЕНОМ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Д.С. Спасская, А.И. Давлетишин, Д.С. Карпов

Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

Ген *URA3*, кодирующий один из ферментов биосинтеза урацила оротодин-5'-фосфатдекарбоксилазу, часто используется в качестве селективного маркера в клетках *Saccharomyces cerevisiae*. Этот маркер также нередко используется для последовательного внесения изменений в геном дрожжей, например, для удаления целевых генов и последующего выщепления *URA3* при помощи контрселекции на среде с 5-фтороротовой кислотой (5-FOA). Соответствующий метод «бесследного» выщепления *URA3* основан на использовании донора для гомологичной рекомбинации – фрагмента ДНК, содержащего фланки, гомологичные последовательностям, окружающим маркер. Трансформация клеток *URA+* таким донором и последующая контрселекция на среде с токсичным предшественником урацила в теории приводит к появлению колоний, в которых *URA3* заменен на последовательность донора, так как в присутствии рабочего маркера клетки погибают. Однако на практике отобрать таким способом клоны, в которых маркер действительно выщепился, достаточно сложно из-за высокого уровня мутагенеза по *URA3* [1]. Чтобы избежать времязатратного отбора клонов при неэффективном выщеплении, мы сделали плазмиду на базе технологии CRISPR-Cas9, кодирующую нуклеазу Cas9 и направляющую РНК против *URA3*. Ко-трансформация такой плазмидой и донором для гомологичной рекомбинации («заплаткой») приводит к появлению двуцепочечного разрыва в последовательности маркера, который, из-за предпочтения пекарских дрожжей репарации по пути гомологичной рекомбинации, заливается преимущественно встройкой донора [2]. Отбор клонов в данном случае не требует контрселекции, а эффективность точного встраивания целевой последовательности донора вместо маркера достигает 50 процентов. При помощи данного метода мы успешно внесли мутацию в геномную последовательность гена фактора транскрипции *RPN4* [3], а также встроили ген цветного белка TinselPurple под промотор *pADH1* вместо гена *ADH1*.

В экспериментах по замене геномных последовательностей использовали штамм *Saccharomyces cerevisiae* BY4742 (Euroscarf). CRISPR-система для разрезания гена *URA3* была сконструирована на базе плазмиды pV1382 [2] путем замены селективного маркера на *LEU2* и клонирования под промотор *SNR52* спейсера GAGTAAAAAATTGTACTTGG в составе комплементарных олигонуклеотидов, образующих соответствующие липкие концы, по сайту рестрикции BsmBI.

Внесение мутации Q516ST [4], создающей стоп-кодон сразу за последовательностью, кодирующей ДНК-связывающий домен, в геномную последовательность гена фактора транскрипции *RPN4*, проводили в два этапа. На первом этапе последовательность гена удаляли простым нокаутом с геном *URA3*,

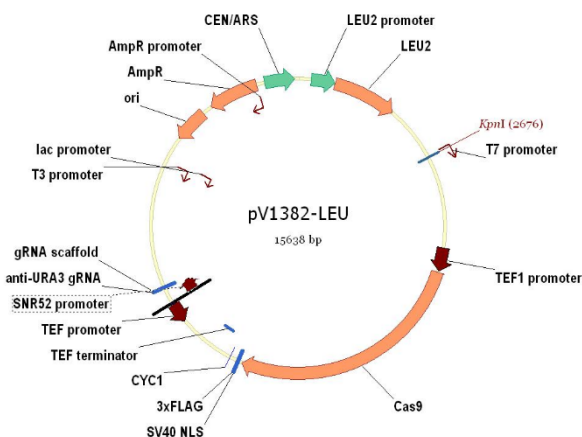


Рисунок 1. Схема CRISPR-плазмиды pV1382-antiURA

фланкированным гомологичными *RPN4* последовательностями (кассету получали в один этап при помощи ПЦР с длинными праймерами), и последующей селекцией на среде без урацила. Встройку *URA3* в нужное место проверяли с двумя парами праймеров, которые отжигались на *URA3* и фланкирующие локус области. На втором этапе отобранные *URA+* клоны трансформировали плазмидой pV1382-antiURA и кассетой, содержащей последовательность гена *RPN4*-Q516ST, полученную ПЦР-мутагенезом, и фланкированной гомологичными локусу встройки последовательностями размером 50 п.н. Размер кассеты составил примерно 1700 п.н. Трансформанты высевали на селективную среду без лейцина. Отбор клонов проводили по способности расти на среде без урацила и при помощи ПЦР с геномной ДНК и последующего секвенирования для подтверждения наличия мутации. Эффективность встраивания нужной кассеты составила 33 процента (1 положительный клон из трех).

Встройку цветного белка TinselPurple (ATUM Chromogenic ProteinPaintbox) под сильный конститутивный промотор pADH1 проводили по аналогичной схеме в два этапа. На первом этапе ген *ADH1* вырезали URA-кассетой с гомологичными фланками, а на втором в полученные URA⁺ клоны вводили плазмиду pV1382-antiURA и донор для рекомбинации, содержащий последовательность гена TinselPurple, фланкированную гомологичными локусу последовательностями размером 50 п.н. Кассету размером около 1000 п.н. получали при помощи одностадийной ПЦР с длинными праймерами. Отбор клонов проводили при помощи ПЦР (к сожалению, заметного окрашивания колоний встройка гена в этот локус не дала). Эффективность встраивания в нужный локус по обоим фланкам при отборе только на среде без лейцина составила около 50 процентов (при проверке клонов в некоторых случаях были замечены также ПЦР-фрагменты другой длины, что указывает на небольшую вероятность встраивания в нецелевые локусы либо дефекты гомологичной рекомбинации).

По итогам обоих экспериментов можно заключить, что использование CRISPR-системы против гена *URA3* в клетках *Saccharomyces cerevisiae* представляет собой эффективную замену системе контрселекции на 5-FOA и позволяет встраивать экспрессионные кассеты в нужный геномный локус с точностью до нуклеотида.

Нужно отметить, что система CRISPR-Cas9 позволяет эффективно вносить в геном *Saccharomyces cerevisiae* мутации вообще без использования маркеров [5], однако этап отбора с *URA3* в ряде случаев имеет свои преимущества – так, внесение мутаций в кодирующую область генов в данном случае не требует замены последовательности PAM, которую распознает нуклеаза Cas9. Кроме того, в этом случае детектировать встройку донора можно только по ПЦР. Использование универсальной плазмиды pV1382-antiURA позволяет исключить этап конструирования CRISPR-плазмид и подбора направляющих РНК для каждого отдельного локуса. Однако, URA-опосредованный метод редактирования генома неприменим для генов, делеция которых летальна.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ 18-04-00692 А и 18-29-07015 мк.

ЛИТЕРАТУРА

1. Boeke JD, Trueheart J, Natsoulis G, Fink GR. 5-Fluoroorotic acid as a selective agent in yeast molecular genetics. *Methods Enzymol.* 1987; 154:164–175.
2. Vyas VK, Bushkin GG, Bernstein DA, et al. New CRISPR Mutagenesis Strategies Reveal Variation in Repair Mechanisms among Fungi. *mSphere.* 2018; 3(2):e00154–18.
3. Mannhaupt G, Schnall R, Karpov V, Vetter I, Feldmann H. Rpn4p acts as a transcription factor by binding to PACE, a nonamer box found upstream of 26S proteasomal and other genes in yeast. *FEBS Lett.* 1999; 450(1–2):27–34.
4. González-Ramos D, van den Broek M, van Maris AJ, Pronk JT, Daran JM. Genome-scale analyses of butanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* reveal an essential role of protein degradation. *Biotechnol Biofuels.* 2013; 6(1):48.
5. Karpov DS, Spasskaya DS, Nadolinskaia NI, Tutyaeva VV, Lysov YP, Karpov VL. Deregulation of the 19S proteasome complex increases yeast resistance to 4-NQO and oxidative stress via upregulation of Rpn4 – and proteasome-dependent stress responsive genes. *FEMS Yeast Res.* 2019; 19(2):10.1093/femsyr/foz002.