

УДК 579.663

## Применение CRISPR/Cas9-системы редактирования генома в дрожжах *Yarrowia lipolytica* для инактивации гена *YlACL2*, кодирующего АТФ-зависимую цитратлиазу

© 2020 Е. Ю. ЮЗБАШЕВА<sup>1,\*</sup>, Т. В. ЮЗБАШЕВ<sup>2</sup>, Е. Б. ВИНОГРАДОВА<sup>1</sup>, Ю. М. КОСИХИНА<sup>1</sup>, М. О. ТАРАТЫНОВА<sup>1,\*\*</sup>, Д. А. ДЕМЕНТЬЕВ<sup>1</sup>, А. И. СОЛОВЬЕВ<sup>3</sup>, Д. А. ЕГОРОВА<sup>3</sup>, С. П. СИНЕОКИЙ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» (НИЦ «Курчатовский институт»–ГосНИИгенетика), Москва, 117545

<sup>2</sup>Имперский колледж Лондона, Лондон, SW7 2AZ Великобритания

<sup>3</sup>Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, Минздрав России, Москва, 123098

\*e-mail: enja\_t@mail.ru;

\*\*e-mail: mtaratynova@inbox.ru

Поступила в редакцию 21.11.2019 г.

После доработки 14.01.2020 г.

Принята к публикации 22.01.2020 г.

Проведена инактивация гена *YlACL2* в дрожжах *Yarrowia lipolytica* двумя способами: традиционным методом с использованием генетической конструкции с маркером, позволяющим восстанавливать прототрофность по урацилу, и без маркера, с помощью CRISPR/Cas9-системы редактирования генома. Эффективность инактивации гена *YlACL2* традиционным методом составила 4% (1 штамм  $\Delta YlACL2$  из 24 проверенных трансформантов), тогда как эффективность инактивации гена *YlACL2* с помощью CRISPR/Cas9-системы была 75% (18 штаммов  $\Delta YlACL2$  из 24 проверенных трансформантов). Штаммы с инактивированным геном *YlACL2* не способны утилизировать цитрат в качестве единственного источника углерода. Была изучена кинетика роста штамма  $\Delta YlACL2$  на среде с глюкозой и ацетатом в качестве единственных источников углерода. Тот факт, что  $\Delta YlACL2$  способен расти на минимальной среде с глюкозой, свидетельствует либо о наличии дополнительного пути транспорта ацетильной группы из митохондрии, либо о возможности синтеза ацетил-КоА в обход пируватдегидрогеназного комплекса в дрожжах *Y. lipolytica*.

**Ключевые слова:** *Yarrowia lipolytica*, CRISPR/Cas9-система, ацетил-КоА, АТФ-зависимая цитратлиаза.

**doi:** 10.21519/0234-2758-2020-36-1-16-24

Дрожжи *Yarrowia lipolytica* – облигатно аэробные аскомицетовые гетероталлические диморфные дрожжи. Для своего роста и развития в качестве источника углерода они могут использовать глюкозу, глицерин, спирты, ацетат, цитрат и гидрофобные субстраты, такие как алканы, жирные кислоты и триацилглицериды [1]. Промышленное использование дрожжей *Y. lipolytica* как источника кормового белка началось еще в 1950 г. компанией British Petroleum (Великобритания) [2]. С 2000-х гг. стали интенсивно применяться методы геномной и метаболической инженерии для разработки промышленных штаммов *Y. lipolytica*, более того был выведен на рынок ряд препаратов, основанных на данных штаммах. Так, в компании DuPont (США) разработали препараты, обогащенные омега-3 жирными кислотами и используемые в качестве кормовой добавки для рыб (Verlasso™) и пищевой добавки (New Harvest™) [2, 3]. Дрожжи *Y. lipolytica* зарекомендовали себя как микроорганизм, приемлемый для конструирования генетически-модифицированных штаммов, и в настоящее время уже существует крупномасштабная промышленная практика (Good Industrial Large Scale Practice, GILSP) использования данных штаммов [4].

Дрожжи *Yarrowia lipolytica* – облигатно аэробные аскомицетовые гетероталлические диморфные дрожжи. Для своего роста и развития в качестве источника углерода они могут использовать глюкозу, глицерин, спирты, ацетат, цитрат и гидрофобные субстраты, такие как алканы, жирные кислоты и триацилглицериды [1]. Промышленное использование дрожжей *Y. lipolytica* как источника кормового белка началось еще в 1950 г. компанией British Petroleum (Великобритания) [2]. С 2000-х гг. стали интенсивно применяться методы геномной и метаболической инженерии для разработки промышленных штаммов *Y. lipolytica*, более того был выведен на рынок ряд препаратов, основанных на данных штаммах. Так, в компании DuPont (США) разработали препараты, обогащенные омега-3 жирными кислотами и используемые в качестве кормовой добавки для рыб (Verlasso™) и пищевой добавки (New Harvest™) [2, 3]. Дрожжи *Y. lipolytica* зарекомендовали себя как микроорганизм, приемлемый для конструирования генетически-модифицированных штаммов, и в настоящее время уже существует крупномасштабная промышленная практика (Good Industrial Large Scale Practice, GILSP) использования данных штаммов [4].

**Список сокращений:** ACL – АТФ-зависимая цитратлиаза, РАМ – смежный мотив протоспейсера, sgRNA – единая направляющая РНК, ОП<sub>600</sub> – оптическая плотность

Конструирование промышленно-значимого штамма-продуцента требует нескольких раундов метаболической инженерии. Традиционный метод редактирования генома дрожжей *Y. lipolytica* основан на использовании экспрессионной кассеты для встраивания в геном дрожжей, содержащей генетический маркер, который для повторного использования необходимо удалить посредством сайт-специфической рекомбинации с помощью системы Cre-lox [5], что является длительным 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 геном, в заданный локус [6]. Преодолеть недостатки традиционного метода редактирования генома позволила CRISPR/Cas9-система [7]. CRISPR – короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами, совместно с ассоциированными белками Cas. Первоначально они были обнаружены у бактерий и архей как приобретенный иммунный механизм клеток [8, 9]. В настоящее время система II типа CRISPR/Cas9 интенсивно разрабатывается в качестве эффективного генетического инструмента для редактирования генома многочисленных представителей эукариот и прокариот [10, 11]. CRISPR-ассоциированная эндонуклеаза Cas9 связывается с направляющей CRISPR-РНК (crRNA) и *транс*-кодируемой CRISPR-РНК (tracrRNA). Для упрощения системы редактирования была разработана единая направляющая РНК (sgRNA), состоящая из crRNA и tracrRNA [12]. 5'-конец crRNA содержит 20 нуклеотидов, комплементарных ДНК-мишени выбранного для введения модификации локуса. В свою очередь ДНК-мишень представляет собой последовательность 5'-N20-NGG-3', где N обозначает любой нуклеотид, а NGG – смежный мотив протоспейсера (PAM). Сначала Cas9 распознает PAM, а после этого прилегающая ДНК проверяется на комплементарность crRNA. Разрезание ДНК-мишени осуществляется путем внесения разрыва в обе цепи ДНК. В эукариотах двунитевые разрывы репарируются путем гомологичной или негомологичной рекомбинации. В результате негомологичной рекомбинации с высокой частотой возникают ошибки (делеции или инсерции пар нуклеотидов), что может приводить к инактивации гена [10]. Для репарации двунитевого разрыва путем гомологичной рекомбинации необходимо также введение генетической кассеты, содержащей участки гомологии к заданному локусу. Данная генетическая кассета может содержать

гены для сверхэкспрессии, которые таким образом будут интегрированы в выбранный локус на хромосоме [13].

Дрожжи *Y. lipolytica* относятся к группе маслянистых микроорганизмов, способных накапливать в значительных количествах нейтральные липиды, что указывает на их отличительную особенность эффективно синтезировать ацетил-КоА как предшественника ацильной группы в липидах [14]. Синтез ацетил-КоА при росте на углеводах осуществляется в митохондриях посредством пируватдегидрогеназного комплекса. Ацетил-КоА транспортируется в цитозоль в виде цитрата с помощью цитратного митохондриального транспортера [15]. В цитозоле транспортированный из митохондрии цитрат расщепляется до ацетил-КоА и оксалоацетата с помощью фермента АТФ-цитратлиаза (ACL) [14]. Наличие данного фермента является отличительной особенностью маслянистых микроорганизмов [16]. В дрожжах *Y. lipolytica* фермент АТФ-цитратлиаза состоит из двух субъединиц, кодируемых генами *YACL1* и *YACL2*. Ранее в литературе было продемонстрировано, что инактивация гена *YACL1* снижает синтез нейтральных липидов на 60–80% [17].

Целью данного исследования является сравнение двух способов редактирования генома: традиционного метода с использованием маркера *URA3*, кодирующего оротидин-5-фосфатдекарбоксилазу, и CRISPR/Cas9-системы на примере инактивации гена *Y. lipolytica YACL2*, а также изучение физиологических особенностей рекомбинантного штамма  $\Delta Ylacl2$ .

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

### Штаммы и среды

Для стандартных генно-инженерных работ (конструкция плазмид, наработка плазмидной ДНК) использовали штамм *E. coli* XL1-Blue (recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)]). Бактерии выращивали при 37 °С в среде LB (г/л): триптон – 10; дрожжевой экстракт – 5; NaCl – 5, при необходимости добавляли ампициллин с концентрацией 100 мкг/мл.

Дрожжи *Y. lipolytica* выращивали при 30 °С на минимальных средах (YNB, Himedia G091 – 0.67% yeast nitrogen base, Difco, USA; YNBD – с добавлением глюкозы 20 г/л; YNBDAc – с добавлением глюкозы 20 г/л и ацетата 1 г/л; YNBCitr – с добавлением цитрата 20 г/л) и на полноценных средах (YPD – пептон 5 г/л, дрожжевой экстракт 3 г/л, глюкоза 20 г/л; YPDAc-hph – с добавлением ацетата 1 г/л и гигромицина 450 мкг/мл). Все плотные среды содержали агар в концентрации 20 г/л.

## Конструирование плазмид

Стандартные генно-инженерные манипуляции (обработка ДНК ферментами, трансформация *E. coli*) проводились в соответствии с лабораторным руководством по молекулярному клонированию [18]. Все ферменты для молекулярных работ были получены от компании «Thermo Fisher Scientific» (США). Праймеры, используемые в работе, синтезированы фирмой «Евроген» (Москва) и приведены в табл. 1. Все фрагменты ДНК *Y. lipolytica* были амплифицированы методом ПЦР с геномной ДНК дикого штамма W29. Нуклеотидная последовательность клонированных ПЦР продуктов была определена секвенированием по обеим цепям ДНК.

Плазмида pUC-fl*YACL2-URA3*lox для инактивации гена *YACL2* была сконструирована следующим образом. Фрагменты ДНК, гомологичные хромосомальным областям, расположенным в промоторной (*YACL2-Up*) и терминаторной (*YACL2-Down*) частях выключаемого гена *YACL2*, амплифицировали с помощью праймеров *YACL2-Up-DraI-F* и *YACL2-Up-R*, а также *YACL2-Down-F*

и *YACL2-Down-DraI-R* соответственно. Нуклеотидную последовательность гена *URA3* амплифицировали с помощью праймеров Lox66-*URA3-F* и Lox71-*URA3-R*. Вектор pUC19 обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *AatII* и *HindIII*. Сборку четырех фрагментов *YACL2-Up*, *YACL2-Down*, *URA3* и pUC19 (*AatII/HindIII*) осуществляли с помощью метода Гибсона [19] для получения плазмиды pUC-fl*YACL2-URA3*lox.

Плазмида pCRISPR-hph-sg*YACL2* для инактивации гена *YACL2* с помощью CRISPR/Cas9-системы была сконструирована на базе разработанной эписомальной плазмиды pCRISPRy1 [20]. Плазмида pCRISPRy1 содержит ген *Cas9* под регулирующей сильной гибридной промотора UAS1B8-TEF(136) [21], характеризующийся оптимизированными кодонами для *Y. lipolytica* и обладающий С-терминальным сигналом ядерной локализации. Плазмида pCRISPRy1 также содержит промотор полимеразы III типа SCR1, слитый с тРНК-глицином для экспрессии sgRNA и маркер *LEU2*, кодирующий 3-изопропилмалатдегидрогеназу, для отбора по прототрофности к лейцину. Ген устойчивости к гигромицину (*hph*) был амплифицирован

Таблица 1

### Праймеры, используемые в работе

#### Primers used in the work

Олигонуклеотид	Последовательность олигонуклеотида, 5'→3'
<i>YACL2-Up-DraI-F</i>	GGG TTC CGC GCA CAT TTC CCC GAA AAG TGC CAC CTG ACG TAA TTT AAA TTG TTA CGT AAC TTA TCT CTC
<i>YACL2-Up-R</i>	TTA TAC GAA CGG TAG AGA GGG GGG GGG TGG GGC TCG AAT TGT GTC GGA TTC GGT GTG T
<i>YACL2-Down-F</i>	CGA ACG GTA CCT CCT CCC CCC GCC CAC CTC GGT ACC CGG GAG GAA TCG CCA ACT TCA CC
<i>YACL2-Down-DraI-R</i>	TTC ACA CAG GAA ACA GCT ATG ACC ATG ATT ACG CCA AGC TAA TTT TAA ATA AGT CGC AAT TAC CCC CA
Lox66- <i>URA3-F</i>	CCC CAC CCC CCC CCT CTC TAC CGT TCG TAT AAT GTA TGC TAT ACG AAG TTA TTG TGA CTG GGG ATG TAG T
Lox71- <i>URA3-R</i>	GTG GGC GGG GGG AGG AGG TAC CGT TCG TAT AGC ATA CAT TAT ACG AAG TTA TCA GCT GCA ACG TCA TTG
<i>YACL2-chr-F</i>	GAG ACG GGA AGA CGG CAT T
<i>YACL2-chr-R</i>	CTC CTT CAA TTT TGC TCG CAT C
hph-to-pCRISPRy1-F	ATG TAG TGT ACC TCT AAA AAT GAA ATA CAG TGC CAA AAG CTC GTT TAA ACT GGA TGG CG
hph-to-pCRISPRy1-R	CGG ATA TAC TTG CTT GAA TAT ACA GTA GTA TGG GAT CCC CGG GTT AAT TAA G
CEN-to-hph-F	GGG GAT CCC ATA CTA CTG TAT ATT CAA GCA A
CEN-sgRNA- <i>YACL2</i> -sgRNA-R	G ATG GGC CCC CGG TTC GAT TCC GGG TCG GCG CAG GTT GAC GTG TAC TGG ATC TCA TGA CCC GGT TTT AGA GCT AGA AAT AGC A

Примечание: последовательность 20 нуклеотидов, комплементарных выбранному локусу гена *YACL2*, обозначена подчеркиванием.

с вектора pARS-Cre [22] с помощью праймеров hph-to-pCRISPRyl-F и hph-to-pCRISPRyl-R. ДНК фрагмент, состоящий из центromеры CEN и sgRNA-*YIACL2*, амплифицировали с плазмиды pCRISPRyl с помощью праймеров CEN-to-hph-F и CEN-sgRNA-*YIACL2*-sgRNA-R. 20 нуклеотидов ДНК-мишени были выбраны в пределах консервативного домена гена *YIACL2*, ответственного за связывание цитрата, с помощью программы СНОРСНОР [23] и вписаны в праймер CEN-sgRNA-*YIACL2*-sgRNA-R (табл. 1). Плазмиду pCRISPRyl обрабатывали эндонуклеазами рестрикции *NcoI* и *XmaI*. Сборку трех фрагментов – *hph*, CEN-sgRNA-*YIACL2* и pCRISPRyl (*NcoI/XmaI*) – осуществляли с помощью метода Гибсона для получения плазмиды pCRISPR-hph-sg*YIACL2*.

### Генетическая трансформация *Y. lipolytica*

Трансформацию дрожжей *Y. lipolytica* проводили методом электропорации [24]. ДНК кассета fl*YIACL2-URA3*lox была получена из плазмиды pUC-fl*YIACL2-URA3*lox путем обработки эндонуклеазой рестрикции *DraI* и использована для трансформации штамма W29(Ura-) [22]. После трансформации клетки высевали на агаризованную среду YNBDAc. Плазмида pCRISPR-hph-sg*YIACL2* была использована для трансформации штамма W29. После трансформации клетки инкубировали на протяжении трех суток в жидкой селективной среде YPDAc-hph, затем высевали разные разведения на агаризованную среду YPDAc. 24 трансформанта с каждой трансформации были изолированы и рассеяны до отдельной колонии на селективной среде.

### Изучение фенотипа, генотипа и скорости роста

Отобранные трансформанты были пересеяны на агаризованную и в жидкую среды YNBCitr для анализа фенотипа. Из трансформантов, не способных расти на среде YNBCitr, была изолирована геномная ДНК и проведены ПЦР-анализы. В случае трансформации кассетой fl*YIACL2-URA3*lox использовали праймеры *YIACL2*-chr-F и *YIACL2*-chr-R, а для подтверждения интеграции кассеты fl*YIACL2-URA3*lox в заданный локус (*YIACL2*) – *YIACL2*-chr-F и *Lox71-URA3*-R, *Lox66-URA3*-F и *YIACL2*-chr-R. Трансформант с интегрированной кассетой в нужный локус был обозначен как W29Δ*YIacl2*. В случае трансформации плазмидой pCRISPR-hph-sg*YIACL2* были секвенированы ПЦР-продукты, полученные при амплификации с геномной ДНК трансформантов № 2, 3 и 5, не способных расти на среде с цитратом (Рис. 4). Для проведения ПЦР-реакции использовали праймеры *YIACL2*-chr-F и *YIACL2*-chr-R. Для дальнейшей работы был выбран трансформант № 5.

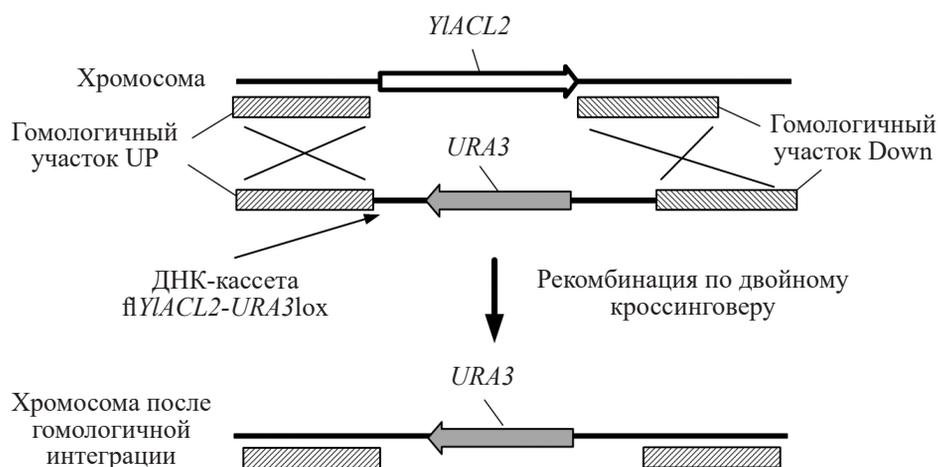
Изучение скорости роста штамма W29Δ*YIacl2* с инактивированным с помощью CRISPR/Cas9-системы геном *YIACL2* и контрольного штамма (W29) дрожжей *Y. lipolytica* было проведено на качалочном инкубаторе-спектрофотометре (Advantec MFS Inc., США) в рабочем объеме 5 мл, в среде YNB, содержащей источник углерода (глюкоза, цитрат или ацетат) с конечной концентрацией 8 г/л. Посев осуществляли титром  $3 \cdot 10^5$  кл/мл. Посевную культуру выращивали в жидкой YPD-среде в течение 24 ч. Скорость роста и время удвоения клеток были посчитаны в экспоненциальной фазе роста.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### Инактивация гена *YIACL2* традиционным методом

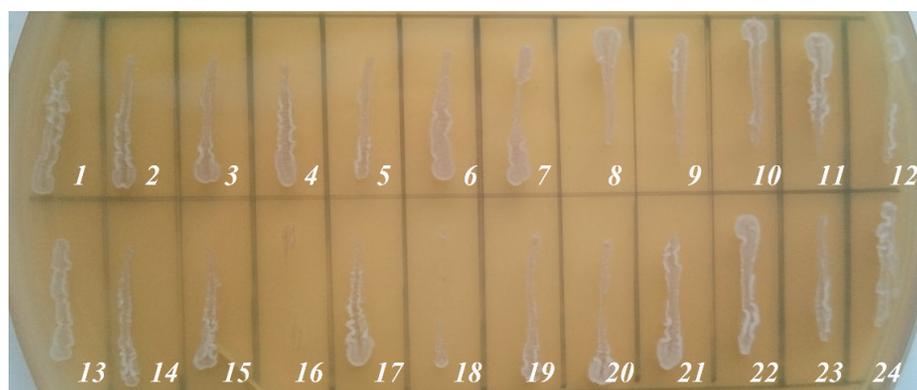
Для инактивации гена *YIACL2*, кодирующего фермент АТФ-зависимую цитратлиазу, традиционным методом была сконструирована плазмида pUC-fl*YIACL2-URA3*lox, содержащая гомологичные хромосомальные области, экранирующие ген *YIACL2* (Up и Down), и селективный маркер – ген *URA3*, кодирующий оротидин-5-фосфатдекарбоксилазу. Ауксотрофный по урацилу штамм *Y. lipolytica* W29(Ura-) трансформировали генетической кассетой fl*YIACL2-URA3*lox. Трансформанты отбирали по восстановлению прототрофности к урацилу. С определенной вероятностью генетическая кассета встраивалась в хромосому с помощью механизма гомологичной рекомбинации по двойному кроссинговеру, заменяя тем самым диккий локус (ген *YIACL2*) на сконструированную кассету как изображено на рис. 1.

Можно было предположить, что штамм с нерабочим геном, кодирующим АТФ-зависимую цитратлиазу, будет отличаться значительным дефектом в росте или отсутствием роста на среде, содержащей цитрат в качестве единственного источника углерода. Исходя из этого предположения, 24 отобранных трансформанта были пересеяны на агаризованную (рис. 2) и в жидкую среду YNBCitr (рис. 3). Действительно, один из проверенных трансформантов характеризовался полным отсутствием роста в среде YNBCitr (№16, рис. 2 и 3). ПЦР-анализ локуса *YIACL2*, проведенный для данного трансформанта, доказал встраивание генетической кассеты fl*YIACL2-URA3*lox в гомологичный локус на хромосоме и инактивацию гена *YIACL2*. Остальные трансформанты соответствовали интеграции генетической кассеты в случайные локусы посредством негомологичной рекомбинации. Таким образом, эффективность инактивации гена *YIACL2* традиционным методом составила 4%.



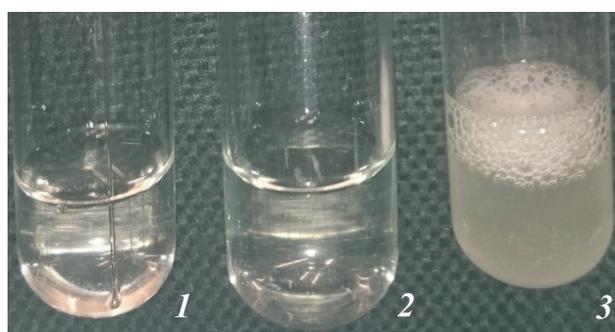
**Рис. 1.** Схематическое изображение инактивации гена *YIACL2* путем встраивания генетической конструкции  $\text{flYIACL2-URA3lox}$  в гомологичный локус на хромосоме *Y. lipolytica*

**Fig. 1.** The schematic illustration of *YIACL2* gene inactivation by integration of  $\text{flYIACL2-URA3lox}$  cassette integration to homologous locus in *Y. lipolytica* chromosome



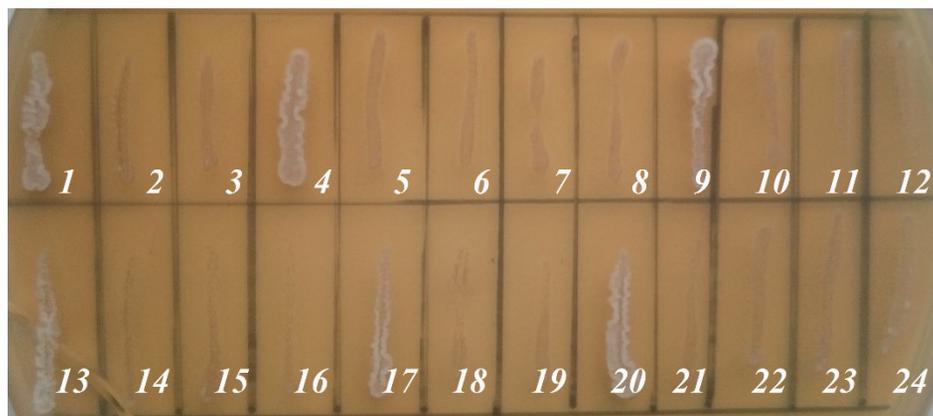
**Рис. 2.** Рост клонов (1–24), отобранных после трансформации штамма *Y. lipolytica* W29(Ura-) экспрессионной кассетой  $\text{flYIACL2-URA3lox}$ , на агаризованной среде YNBCitr, содержащей цитрат в качестве единственного источника углерода

**Fig. 2** The growth of clones (1–24) selected after transformation of *Y. lipolytica* W29(Ura-) strain with the expression cassette  $\text{flYIACL2-URA3lox}$  on YNBCitr agar medium containing citrate as the sole carbon source



**Рис. 3.** Отсутствие роста штаммов с инактивированным геном *YIACL2* в минимальной жидкой среде с цитратом в качестве единственного источника углерода (1, 2). Культуры росли при 30 °C в течение 4 сут. Посев осуществляли титром  $3 \cdot 10^5$  кл/мл. 1 – штамм W29 $\Delta YIacl2$ , полученный посредством гомологичной рекомбинации с использованием генетической конструкции  $\text{flYIACL2-URA3lox}$ ; 2 – штамм W29 $\Delta YIacl2$ , полученный с помощью CRISPR/Cas9-системы редактирования генома; 3 – контрольный штамм W29

**Fig. 3.** The lack of the growth of recombinant strains with inactivated *YIACL2* gene in a minimal liquid medium containing citrate as the sole carbon source. Cultures were grown for 4 days at 30 °C. Inoculation was carried out to a final titre of  $1 \cdot 10^5$  cells/mL. 1 – W29 $\Delta YIacl2$  strain obtained by the traditional method of gene inactivation by homologous recombination using the genetic construct  $\text{flYIACL2-URA3lox}$ ; 2 – strain W29 $\Delta YIacl2$  strain obtained using CRISPR/Cas9 system; 3 – the control strain W29



**Рис. 4.** Рост клонов (1–24), отобранных после трансформации штамма *Y. lipolytica* W29(Ura-) эписомальной плазмидой pCRISPR-hph-sg*YIACL2*, на агаризованной среде YNBCitr, содержащей цитрат в качестве единственного источника углерода.

**Fig. 4** The growth of clones (1–24) selected after transformation of *Y. lipolytica* W29 (Ura-) strain with episomal plasmid pCRISPR-hph-sg*YIACL2* on YNBCitr agar medium containing citrate as the sole carbon source.

### Инактивация гена *YIACL2* с помощью CRISPR/Cas9-системы

Для инактивации гена *YIACL2* с помощью CRISPR/Cas9-системы редактирования генома была сконструирована эписомальная плаزمида pCRISPR-hph-sg*YIACL2*, содержащая ген, кодирующий эндонуклеазу Cas9, нуклеотидную последовательность, кодирующую направляющую sgRNA к консервативному домену гена *YIACL2*, а также маркер устойчивости к гирномицину (*hph*). Штамм *Y. lipolytica* W29 трансформировали pCRISPR-hph-sg*YIACL2*, отбор трансформантов осуществляли по устойчивости к гирномицину. 18 трансформантов из отобранных 24 трансформантов не росли в минимальной среде YNBCitr (рис. 4). Результаты секвенирования консервативного домена гена *YIACL2*, проведенного для трех данных трансформантов, показали наличие делеций, подтверждающих инактивацию гена *YIACL2* (рис. 5). Таким образом, эффективность инактивации гена *YIACL2* с помощью CRISPR/Cas9-системы составила 75%.

### Влияние инактивации гена *YIACL2* на рост в среде, содержащей глюкозу или ацетат в качестве единственного источника углерода

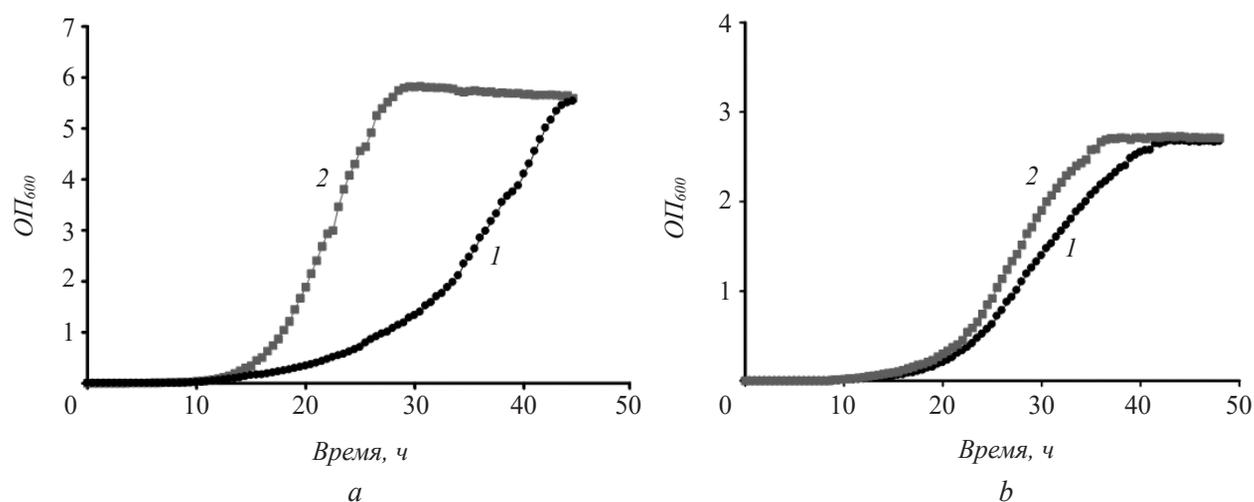
Инкубацию и построение кривых роста штамма W29Δ*YIacl2* и контрольного штамма W29 в минимальной среде, содержащей глюкозу или ацетат в качестве единственного источника углерода, осуществляли как описано в разделе Условия эксперимента.

При росте в минимальной среде с глюкозой штамм W29Δ*YIacl2* характеризовался длительной лаг-фазой роста (рис. 6а, 1) и достигал стационарной фазы роста к 45-му часу инкубации, тогда как контрольный штамм W29 (рис. 6а, 2) достигал стационарной фазы уже к 29-му часу инкубации. Удельная скорость роста и время удвоения клеток штамма W29Δ*YIacl2* составляли 0,15 ч<sup>-1</sup> и 4,7 ч соответственно. Значения данных параметров значительно уступают таковым для W29, удельная скорость роста которого составляла 0,28 ч<sup>-1</sup>, а время удвоения клеток – 2,3 ч.

<b><i>YIACL2</i> wild type</b>	<b>TACGCCAAAACCGTACTGGATCTCATGACCCGGGGCGACGCTCACCCCGAGGGC</b>
<b>delta<i>YIACL2</i> clon 2</b>	<b>TACGCCAAAACCGTACTGGATCTCATGACC-<u>GGGGCGACGCTCACCCCGAGGGC</u></b>
<b>delta<i>YIACL2</i> clon 3</b>	<b>TACGCCAAAACCGTACTGGATCTCATGACC-<u>GGGGCGACGCTCACCCCGAGGGC</u></b>
<b>delta<i>YIACL2</i> clon 5</b>	<b>TACGCCAAAACCGTACTGGATCT-----<u>GGGGCGACGCTCACCCCGAGGGC</u></b>

**Рис. 5.** Результаты секвенирования консервативного домена гена *YIACL2* трансформантов № 2, 3 и 5, проведенного для подтверждения инактивации гена. Серым выделена последовательность 20 пн ДНК-мишени, подчеркиванием выделен смежный мотив протоспейсера (PAM)

**Fig. 5.** Alignment of sequencing results for screening *YIACL2* disruption. The sequence of 20 nucleotides of the target DNA is highlighted in gray, the motif of the adjacent protospacer (PAM) is underlined



**Рис. 6.** Кривые роста штамма W29ΔYlacl2 (1) и контрольного штамма W29 (2) при инкубации в минимальной среде, содержащей глюкозу (a) и ацетат (b) в качестве единственного источника углерода

**Fig. 6.** Growth curves of strains W29ΔYlacl2 (1) and W29 (2) grown on minimal medium containing glucose (a) and acetate (b) as a single carbon source

Несмотря на значительное негативное влияние инактивации гена *Ylacl2*, штамм W29ΔYlacl2 все же способен расти на минимальной среде с глюкозой в качестве единственного источника углерода, что свидетельствует либо о наличии дополнительного пути транспорта ацетильной группы из митохондрии в дрожжах *Y. lipolytica*, помимо цитрата, либо о возможности синтеза ацетил-КоА в обход пируватдегидрогеназного комплекса. В дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* описано несколько путей транспорта ацетильной группы между компартментами [25]. Во-первых, помимо синтеза ацетил-КоА в митохондрии, дрожжи, способные к брожению, генерируют цитозольный ацетальдегид, который превращается в ацетил-КоА в обход пируватдегидрогеназного комплекса, в результате последовательных реакций пируватдекарбоксилазы, альдегиддегидрогеназы и ацетил-КоА-синтетазы. В дрожжах *S. cerevisiae* и *Candida albicans* также описан ацетил-карнитинный шаттл, участвующий в переносе ацетильной единицы между пероксисомой, цитозолем и митохондрией [26, 27]. Была продемонстрирована способность ацетильной группы транспортироваться из митохондрии в цитозоль и обратно в виде ацетата [28]. С помощью митохондриального фермента ацетил-КоА гидролазы осуществляется обратимая реакция гидролиза ацетил-КоА с образованием ацетата. В дрожжах *Y. lipolytica* был выявлен гомолог пируватдекарбоксилазы *S. cerevisiae* [29], а карнитинный шаттл и ацетил-КоА гидролаза пока не изучены.

Инактивация гена *Ylacl2* привела также к ухудшению роста клеток на ацетате в качестве

единственного источника углерода. Так, удельная скорость роста и время удвоения клеток для штамма W29ΔYlacl2 составляли 0,11 ч<sup>-1</sup> и 6,3 ч, соответственно (рис. 6b). Удельная скорость роста контрольного штамма в среде с ацетатом была 0,15 ч<sup>-1</sup>, и время удвоения клеток составляло 4,7 ч.

Таким образом, в результате проведенной работы были получены и охарактеризованы рекомбинантные дрожжи *Y. lipolytica* с инактивированным геном, кодирующим АТФ-зависимую цитратлиазу. Сравнение двух методов введения направленных модификаций в геном дрожжей *Y. lipolytica* на примере инактивации гена *Ylacl2* продемонстрировало эффективность применения CRISPR/Cas9-системы редактирования генома.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при финансовой поддержке государства (Государственное задание № 595-00004-18 ПР) с использованием УНУ – Национальный биоресурсный центр «Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов» и с технической поддержкой Центра коллективного пользования НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика, а также частично поддержана грантом МК-2241.2019.7.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Madzak C., Gaillardin C., Beckerich J.M. Heterologous protein expression and secretion in the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*: a review. *J. Biotechnol.*, 2004, 109(1–2), 63–81. doi: 10.1016/j.jbiotec.2003.10.027

2. Madzak C. *Yarrowia lipolytica*: recent achievements in heterologous protein expression and pathway engineering. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2015, 99(11), 4559–4577. doi: 10.1007/s00253-015-6624-z
3. Xue Z., Sharpe P.L., Hong S.P., et al. Production of omega-3 eicosapentaenoic acid by metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica*. *Nat. Biotechnol.*, 2013, 31(8), 734–740. doi: 10.1038/nbt.2622
4. Groenewald M., Boekhout T., Neuvéglise C., et al. *Yarrowia lipolytica*: safety assessment of an oleaginous yeast with a great industrial potential. *Critical. Rev. Microbiol.*, 2014, 40(3), 187–206. doi: 10.3109/1040841X.2013.770386
5. Fickers P., Le Dall M.T., Gaillardin C., et al. New disruption cassettes for rapid gene disruption and marker rescue in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J. Microbiol. Methods.*, 2003, 55(3), 727–737. doi: 10.1016/j.mimet.2003.07.003
6. Verbeke J., Beopoulos A., Nicaud J.M. Efficient homologous recombination with short length flanking fragments in Ku70 deficient *Yarrowia lipolytica* strains. *Biotechnol. Lett.*, 2013, 35(4), 571–576. doi: 10.1007/s10529-012-1107-0
7. Liu L., Fan X.-D. CRISPR–Cas system: a powerful tool for genome engineering. *Plant Mol. Biol.*, 2014, 85, 209–218. doi: 10.1007/s11103-014-0188-7
8. Barrangou R., Fremaux C., Deveau H., et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 2007, 315(5819), 1709–1712. doi: 10.1126/science.1138140
9. Wiedenheft B., Sternberg S.H., Doudna J.A. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature.*, 2012, 482(7385), 331–8. doi: 10.1038/nature10886
10. Khanzadi M.N., Khan A.A. CRISPR/Cas9: Nature’s gift to prokaryotes and an auspicious tool in genome editing. *J. Basic Microbiol.*, 2019, 1–12. doi 10.1002/jobm.201900420
11. Raschmanová H., Weninger A., Glieder A., et al. Implementing CRISPR-Cas technologies in conventional and non-conventional yeasts: Current state and future prospects. *Biotechnol. Adv.*, 2018, 36(3), 641–665. doi: 10.1016/j.biotechadv.2018.01.006
12. Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012, 337(6096), 816–821. doi: 10.1126/science.1225829
13. Schwartz C., Shabbir-Hussain M., Frogue K., et al. Standardized markerless gene integration for pathway engineering in *Yarrowia lipolytica*. *ACS Synthetic Biology.*, 2016, 6(3), 402–409. doi: 10.1021/acssynbio.6b00285
14. Beopoulos A., Nicaud J.M., Gaillardin C. An overview of lipid metabolism in yeasts and its impact on biotechnological processes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2011, 90(4), 1193–1206. doi: 10.1007/s00253-011-3212-8
15. Yuzbasheva E.Y., Agrimi G., Yuzbashev T.V., et al. The mitochondrial citrate carrier in *Yarrowia lipolytica*: Its identification, characterization and functional significance for the production of citric acid. *Metabolic Engineering*, 2019, 54, 264–274. doi: 10.1016/j.ymben.2019.05.002
16. Boulton C.A., Ratledge C. Correlation of lipid accumulation in yeasts with possession of ATP: citrate lyase. *Microbiol.*, 1981, 127(1), 169–176. doi: 10.1099/00221287-127-1-169
17. Dulermo T., Lazar Z., Dulermo R., et al. Analysis of ATP-citrate lyase and malic enzyme mutants of *Yarrowia lipolytica* points out the importance of mannitol metabolism in fatty acid synthesis. *Biochim. Biophys. Acta.*, 2015, 1851(9), 1107–1117. doi: 10.1016/j.bbaliip.2015.04.007
18. Sambrook J., Maniatis T., Fritsch E. *Molecular cloning: laboratory Manual*, 2nd ed. New York, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
19. Gibson D.G., Young L., Chuang R.Y., et al. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat. Methods.*, 2009, 6(5), 343–345. doi: 10.1038/nmeth.1318
20. Schwartz C.M., Hussain M.S., Blenner M., Wheeldon 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
21. Blazeck J., Liu L., Redden H., Alper H. Tuning gene expression in *Yarrowia lipolytica* using a hybrid promoter approach. *Appl. Environmental Microbiol.*, 2011, 77(22), 7905–7914. doi: 10.1128/AEM.05763-11
22. Yuzbasheva E.Y., Mostova E.B., Andreeva N.I., et al. Co-expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase and acyl-CoA binding protein enhances lipid accumulation in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *N. Biotechnol.*, 2017, 39, 18–21. doi: 10.1016/j.nbt.2017.05.008
23. Labun K., Montague T.G., Gagnon J.A., et al. CHOP-CHOP v2: a web tool for the next generation of CRISPR genome engineering. *Nucleic Acids Res.*, 2016, 44(W1), 272–276. doi: 10.1093/nar/gkw398
24. Юзбашева Е.Ю., Юзбашев Т.В., Константинова Т.К. и др. Способность N- и C-доменов гомолога белка клеточной стенки *Saccharomyces cerevisiae* Flo1p экспонировать липазу Lip2 на поверхности клеток дрожжей *Yarrowia lipolytica*. *Биотехнология*, 2011, (1), 23–33. doi: 10.1134/S000368381108011
25. van Rossum H. M., Kozak B.U., Pronk J.T., van Maris A.J. Engineering cytosolic acetyl-coenzyme A supply in *Saccharomyces cerevisiae*: pathway stoichiometry, free-energy conservation and redox-cofactor balancing. *Metabolic Engineering*, 2016, 36, 99–115. doi: 10.1016/j.ymben.2016.03.006
26. Swiegers J.H., Dippenaar N., Pretorius I.S., Bauer F.F. Carnitine-dependent metabolic activities in *Saccharomyces cerevisiae*: three carnitine acetyltransferases are essential in a carnitine-dependent strain. *Yeast*, 2001, 18(7), 585–595. doi: 10.1002/yea.712
27. Strijbis K., van Roermund C.W., van den Burg J., et al. Contributions of carnitine acetyltransferases to intracellular acetyl unit transport in *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.*, 2010, 285(32), 24335–24346. doi: 10.1074/jbc.M109.094250

28. Chen Y., Zhang Y., Siewers V., Nielsen J. Ach1 is involved in shuttling mitochondrial acetyl units for cytosolic C2 provision in *Saccharomyces cerevisiae* lacking pyruvate decarboxylase. *FEMS Yeast Res.*, 2015, 15(3), fov015. doi: 10.1093/femsyr/fov015
29. Otto C., Yovkova V., Aurich A., et al. Variation of the by-product spectrum during  $\alpha$ -ketoglutaric acid production from raw glycerol by overexpression of fumarase and pyruvate carboxylase genes in *Yarrowia lipolytica*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2012, 95(4), 905–917. doi: 10.1007/s00253-012-4085-1

## Inactivation of *Yarrowia lipolytica* *YlACL2* gene coding subunit of ATP citrate lyase using CRISPR/Cas9 system

© 2020 E. Y. YUZBASHEVA<sup>1,\*</sup>, T. V. YUZBASHEV<sup>2</sup>, E. B. VINOGRADOVA<sup>1</sup>, I. M. KOSIKHINA<sup>1</sup>, M. O. TARATYNOVA<sup>1,\*\*</sup>, D. A. DEMENTEV<sup>1</sup>, A. I. SOLOVYEV<sup>3</sup>, D. A. EGOROVA<sup>3</sup>, S. P. SINEOKY<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Bioresource Center Russian National Collection of Industrial Microorganisms (BRC VKPM), State Research Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms National Research Centre «Kurchatov Institute» (NRC «Kurchatov Institute» – GosNIIGenetika), Moscow, 117545 Russia

<sup>2</sup>Department of Bioengineering, London Imperial College, London, SW7 2AZ Great Britain

<sup>3</sup>Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Russian Ministry of Health, Moscow, 123098 Russia

\*e-mail: enja\_t@mail.ru;

\*\*e-mail: mtaratynova@inbox.ru

Received November 21, 2019

Revised January 14, 2020

Accepted January 22, 2020

**Abstract**—In this study, *YlACL2* was inactivated by two methods: traditional approach based on homologous recombination and uracil marker and markerless system using CRISPR/Cas9. The efficiency of *YlACL2* inactivation using traditional approach was 4% (one  $\Delta YlACL2$  strain out of 24 tested transformants) whereas knockout efficiency using CRISPR/Cas9 system was 75% (18  $\Delta YlACL2$  strains out of 24 tested transformants). *YlACL2* null mutant strains were not able to utilize citrate as a single carbon source. Growth kinetics was investigated in the media with glucose and acetate as a single carbon source. The fact that  $\Delta YlACL2$  is able to grow in the minimal medium with glucose as a single carbon source provides evidence that there is an alternative source of acetyl-CoA on carbohydrate substrates in *Y. lipolytica*.

**Keywords:** *Yarrowia lipolytica*, CRISPR/Cas9 system, ATP citrate lyase, *YlACL2*.

**Acknowledgements**—The work was carried out using the equipment of the Unique Scientific Facility of BRC VKPM with technical support of the Centre for Collective Use of NRC «Kurchatov Institute» – GosNIIGenetika and with financial support of Russian Federation (state task No. 595-00003-19 PR) as well as partially supported by grant No. MK-2241.2019.7.

**doi:** 10.21519/0234-2758-2020-36-1-16-24