

РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОМОВ МИЦЕЛИАЛЬНЫХ ГРИБОВ: ПРИМЕНЕНИЕ СИСТЕМЫ CRISPR/Cas

©2021 г. А. М. РОЖКОВА*, В. Ю. КИСЛИЦИН

*Институт биохимии им. А.Н.Баха, Федеральный
исследовательский центр «Фундаментальные основы
биотехнологии» Российской академии наук, Москва*

I. Введение. II. Состав и принцип действия систем CRISPR/Cas.
III. Стратегия применения системы CRISPR/Cas в геномном
редактировании грибов. IV. Примеры геномного редактирования
мицелиальных грибов. V. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Мицелиальные грибы используются человечеством в качестве источника полезных метаболитов и ферментов на протяжении столетий. Их безусловным преимуществом перед другими промышленными микроорганизмами является способность к секреции большого (до 120–150 г/л) количества белка при относительно простых, дешевых и легко-масштабируемых схемах ферментации. Генетическое разнообразие мицелиальных грибов определяет возможность их использования в качестве источника новых генов, кодирующих ферменты с уникальными свойствами, а также позволяет разрабатывать новые рекомбинантные штаммы с гетерологичной экспрессией промышленно значимых белков [1, 2].

Используемые в современных биотехнологических процессах мицелиальные грибы относятся к родам *Aspergillus* [3–5], *Trichoderma* [6–7], *Penicillium* [8–9, 10], *Acremonium* [11] и т. д. Ферментные препа-

Принятые сокращения: ФП – ферментный препарат, ПЦР – полимеразная цепная реакция, CRISPR-Cas – Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats and CRISPR ASSociated, sgRNA – single-guided RNA, tracrRNA – trans-activating crRNA, DSB – Double Strand Breaks, NHEJ – Non-Homologous End Joining, HR – Homologous Recombination, NLS – Nuclear Localization Sequence НН – HammerHead, HDV – Hepatitis D Virus.

* Адрес для корреспонденции: a.rojkova@fbras.ru

Работа выполнена при частичной поддержке РФФИ (грант № 18-29-07070)

раты (ФП), полученные на основе этих и других штаммов применяют для производства органических кислот и биотоплива, антибиотиков и БАДов, продуктов питания и кормов. Повсеместно ФП добавляются в моющие средства, используются в текстильной, целлюлозно-бумажной промышленности, а также широко применяются при переработке различных отходов [12–13, 14–15].

Основными задачами биотехнологии является выявление новых ферментов и улучшение их операционной стабильности, повышение продуктивности штаммов и их метаболическая инженерия. В мировой практике для решения всех этих задач используются технологии рекомбинантных ДНК [4]. Суть ДНК-технологии, как молекулярно-генетического подхода, состоит в создании индивидуальной экспрессионной системы для каждого мицелиального гриба с адаптированной методикой трансформации. Под системой экспрессии в данном случае понимается получение реципиентного штамма с доминантным или ауксотрофным селекционным признаком и создание интеграционной плазмиды для трансфера экзогенной ДНК в протопласты гриба [16]. Как правило, транскрипционный контроль гетерологичных генов осуществляется за счет «сильного» индуцибельного промотора, т.е. промотора гена, кодирующего максимально синтезирующийся белок в культуральной жидкости реципиентного штамма [17]. Хорошими примерами использования «сильных» промоторов могут являться *cbhI* промотор в *Trichoderma reesei* и *Penicillium verruculosum* [18, 22], *glaA* промотор в *Aspergillus niger* и *P.verruculosum* [19, 20], *xylA* промотор в *Penicillium canescens* [8], *alcA* промотор в *Aspergillus nidulans* [21]. Используя данные промоторы удается получать от 50 до 80% целевого гетерологичного белка от общего количества секретируемых белков [22] при условии применения оптимизированной схемы ферментации.

Отработанная техника гетерологичной экспрессии в производственных штаммах не всегда решает другие немаловажные проблемы, которые возникают при оптимизации экспрессии в рекомбинантных штаммах-суперпродуцентах, например: необходимость понижения протеолитической активности штаммов для снижения протеолиза чужеродных белков [23], снижение уровня микотоксинов для получения более безопасных штаммов [24], получение новых ауксотрофных штаммов для возможности последовательной трансформации и селекции и тд [25]. Промышленно важными также являются задачи, связанные с транскрипционной регуляцией гетерологичной экспрессии: понижение катаболитной репрессии штаммов [26, 27], определение транскрипционных активаторов [28, 29], оптимизация промоторных областей, задействованных в гетерологичной экспрессии

[30–32]. Важно также и увеличение эффективности гомологичной рекомбинации [33–36]. Решения всех этих проблем нацелено на повышение продуктивности рекомбинантных штаммов, что приводит к повышению эффективности технологических процессов за счет снижения текущих затрат на получение ферментного препарата [37].

До недавнего времени существующие подходы улучшения штаммов ограничивались классическим неупорядоченным мутагезом [38, 39], направленной эволюцией [40, 42] и разработкой специальных плазмид для делеции/замещения целевого гена [43] с последующей трансформацией и селекцией новых штаммов. В первом случае, велик риск внесения дополнительных мутаций в геном гриба, в особенности после нескольких этапов проведения мутагеза, что часто приводит к понижению скорости роста мутанта, ухудшению спорулирования или геномной нестабильности [44]. Направленная эволюция также предполагает стадию неупорядоченного мутагеза, где генерация мутантных библиотек происходит направленно с помощью ПЦР [45]. Однако существенным ограничением метода является система скрининга мутантных клонов, поэтому данный метод используется для улучшения конкретных свойств ферментов, а не секретирующего их рекомбинантного штамма [46–48]. Третий способ определяется нокаутом негативных генов путем либо введения делеции/мутации, либо замещением делетируемого гена, например, на ген устойчивости к антибиотику, обеспечивая тем самым дополнительный доминантный признак селекции [43]. Однако создание плазмид замещения требует предварительного клонирования фланкирующих участков длиной от 1500 до 2000 п.о. в 5'- и 3'-область целевого гена от места делеции/инсерции для обеспечения эффективного процесса гомологичной рекомбинации, что при отсутствии генома гриба занимает значительное время.

Альтернативой описанных выше подходов может служить относительно недавно появившаяся техника геномного редактирования, позволяющая вносить быстрые и точные корректировки в геномы прокариот и эукариот.

Редактированием генома называют молекулярно-генетический инструмент, позволяющий добавлять, удалять или перемещать фрагменты ДНК в геноме организма. Это позволяет отключать определённые экспериментатором гены, вносить новые гены в заранее подобранные локусы генома или корректировать последовательности генов в организме [49]. Данный подход в сочетании с секвенированием генов и геномов породил новое направление в генетике – обратную генетику, которая занимается изучением функций генов

с известными нуклеотидными последовательностями за счёт их нокаута или сверхэкспрессии и анализа их влияния на организм [50]. Подход геномного редактирования значительно упрощает работу исследователей, поскольку традиционный метод поиска мутантных вариантов с последующим их генетическим анализом гораздо более трудоемок. Более того, редактирование геномов значительно облегчает решение прикладных задач биотехнологии. Метод позволяет нокаутировать гены, определяющие, например, синтез токсинов [51], изменять метаболические пути для создания организмов-сверхпродуцентов или продуцентов новых веществ и многое другое [52].

Технология CRISPR-Cas (от англ. **C**lustered **R**egularly **I**nterspaced **S**hort **P**alindromic **R**epeats — кластерные короткие регулярные палиндромные повторы (CRISPR) и **C**RISPR **a**ssociated – ассоциированный с CRISPR (CAS)) наиболее новая и перспективная из известных технологий редактирования геномов [53]. Первые работы по применению CRISPR появились в 2013 году [54–56], однако в настоящее время, технология уже широко реализуется в прокариотических и эукариотических организмах от бактерий до человека [52].

Временем открытия CRISPR можно считать 1987 год, когда Ёсидзуми Исино обнаружил необычные повторы в геноме *Escherichia coli* [57]. В дальнейшем Франциско Мохика с 1993 по 2000 год выявил подобные мотивы в геномах ещё 20 микроорганизмов [58]. Однако функциональное значение данных мотивов оставалось неизвестным. В 2002 году Янсен и коллеги установили, что CRISPR-кассеты фланкируются локусами гомологичных белков с нуклеазной и хеликазной активностями [59]. В 2007 году было показано, что система CRISPR-Cas служит для защиты микроорганизмов от бактериофагов [60].

Первые работы по редактированию генома мицелиальных грибов системой CRISPR-Cas были опубликованы в 2015 году [61], ещё ранее были проведены эксперименты по редактированию геномов дрожжей [62–64]. В настоящее время продолжается оптимизация данной системы под особенности работы с мицелиальными грибами и параллельно происходит улучшение самой системы за счёт поиска новых и совершенствования уже известных её компонентов. Ниже будут рассмотрены механизм работы системы CRISPR-Cas и примеры её применения в мицелиальных грибах.

II. СОСТАВ И ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ СИСТЕМ CRISPR-Cas

Система CRISPR-Cas состоит из геномных локусов CRISPR и белков Cas, кодируемых фланкирующими локус генами. Сам локус CRISPR представляет собой прямые повторы ДНК, соединённые короткими, в среднем около 20 пар нуклеотидов, отличающимися последовательностями, называемыми спейсерами. Последовательности спейсеров являются участками ДНК, встроенными в геном в ходе адаптивного иммунного ответа. Cas-белки разделяют на два функциональных модуля: более консервативный модуль адаптации и вариабельный модуль интерференции (эффекторный комплекс). Белки модуля адаптации служат для встраивания в CRISPR-касsetу новых спейсеров, а белки эффекторного комплекса для уничтожения ДНК или РНК, содержащей участок комплементарный последовательности спейсера (рис. 1А) [65].

По составу белков эффекторного комплекса системы CRISPR-Cas делятся на два класса: в первом классе комплекс многосубъединичный, а во втором – моносубъединичный. Каждый класс также разделяется на несколько типов и подтипов по присутствию в эффекторном комплексе ключевого белка, отсутствующего в других типах [66]. Именно эффекторные комплексы второго типа (тип II) в настоящее время используются в системах редактирования генома, что объясняется большей простотой работы с ними (рис. 1Б) [67].

Тем не менее, не смотря на значительные различия состава эффекторных комплексов у различных микроорганизмов принцип работы системы CRISPR-Cas у всех одинаков. Изначально, белки комплекса встраивают в CRISPR-касsetу фрагменты ДНК, которые могут принадлежать фагам, другим мобильным элементам или обрывкам клеточной ДНК, образованным при репарации или терминции транскрипции. Процесс интерференции начинается с транскрипции CRISPR-касsetы с образованием незрелой pre-CRISPR РНК (pre-crRNA), состоящей из множества повторов и спейсеров. Далее, происходит процессинг первичного транскрипта и образование коротких CRISPR РНК (crRNA), содержащих по одному спейсеру, фланкированному фрагментами повторов. После этого формируется эффекторный комплекс из crRNA и белков Cas. Этот комплекс распознаёт мишень в ДНК (комплементарный спейсеру участок, протоспейсер) путём комплементарного взаимодействия между мишенью и спейсером crRNA. Распознавание мишени приводит к гидролизу фосфодиэфирной связи между основаниями в цепи мишени и, соответственно, к её разрушению. Если мишень оказы-

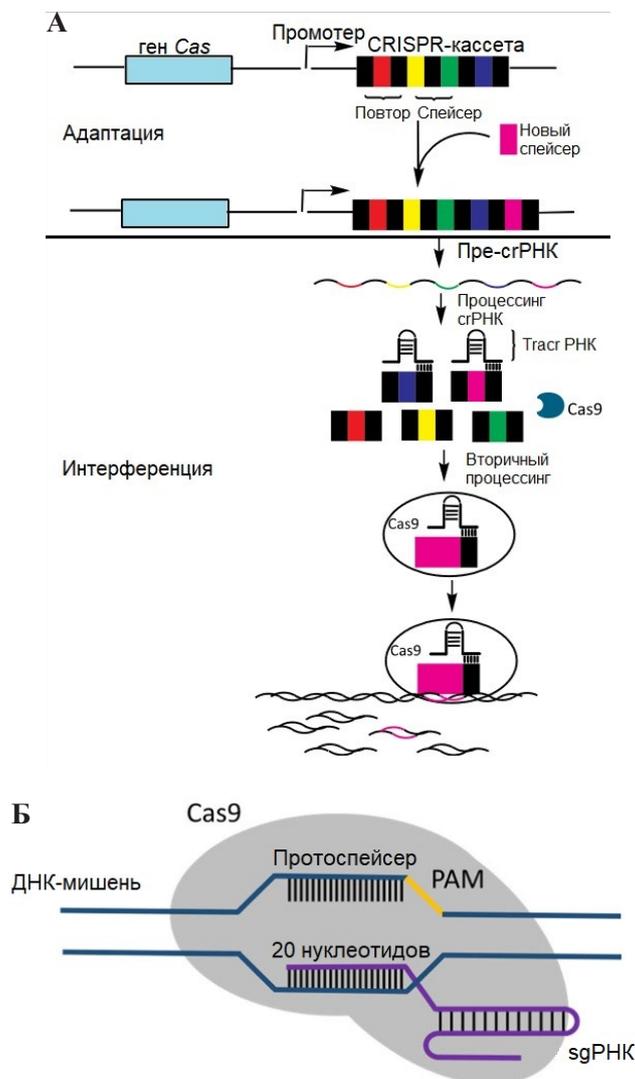


Рис. 1. (А) – Схематическое представление системы CRISPR / Cas. Фрагмент ДНК включается как новый спейсер в CRISPR-кассету после первой атаки. Когда та же самая ДНК повторно попадает в клетку, спейсер экспрессируется в комплексе crRNA-трагсrRNA и направляет белок Cas9 к соответствующей ДНК для расщепления соответствующей последовательности.

(Б) – Система CRISPR / Cas типа II. SgRNA связывается с Cas9 и катализирует двухцепочечные разрывы ДНК, определяя мишень за счёт протоспейсера из 20 оснований.

вается в геноме самой клетки, то это может привести к её собственной гибели (рис. 1А) [68, 69].

CRISPR/CAS СИСТЕМА ВТОРОГО ТИПА (ТИП II)

Основываясь на различиях Cas белков, системы CRISPR/Cas второго класса могут быть классифицированы на 3 типа (II, V, VI) [70, 71]. В отличие от CRISPR/Cas систем I, III и IV типов, в основе которых лежат сложные механизмы комплексного взаимодействия Cas белков для расщепления целевой ДНК, CRISPR/Cas система типа II на основе Cas9 из *Streptococcus pyogenes* более простая и удобная для задач геномного редактирования микроорганизмов [66, 72]. Эффекторный комплекс систем типа II определяется только двумя элементами – Cas9 нуклеазой и направляющей-РНК, sgRNA (guided RNA), которая состоит из двух фрагментов: узнающей мишень в ДНК crRNA, и вспомогательной транскрибирующей РНК, tracrRNA (trans-activating crRNA), которая связывается с crRNA водородными связями и взаимодействует с белком Cas9 [73, 74]. На 5'-конце crRNA находится спейсер определяющий её специфичность к определённому сайту геномной ДНК (рис. 1Б) [75, 76].

Структура и функция белка Cas9 *Streptococcus pyogenes*

Белок Cas9 из *Streptococcus pyogenes* (SpCas9) является представителем белков эффекторного комплекса второго класса и относится к типу II. Он представляет собой мультидоменный и многофункциональный белок, состоящий из 1368 аминокислотных остатков. Третичная структура белка SpCas9 в комплексе с ДНК и sgRNA была определена рентгеноструктурным анализом и криоэлектронной микроскопией (Рис. 2) [77]. SpCas9 состоит из нуклеазного (NUC) и распознающего (REC) сегментов. NUC – сегмент состоит из HNH-подобного нуклеазного домена и RuvC-подобного нуклеазного домена, а также C – концевой домена (CTD), который взаимодействует с PAM (**P**rotospacer **A**djacent **M**otif – последовательность, смежная с протоспейсером). В REC – сегмент входят три α -спиральных домена (REC1–REC3) (рис. 2).

При взаимодействии комплекса SpCas9 – sgRNA с ДНК домен HNH расщепляет цепь ДНК, которая комплементарна протоспейсеру sgRNA, а RuvC – подобный домен вторую цепь. При этом вся глобула Cas9 полностью обхватывает ДНК, которая входит в туннель между доменами CTD и REC1 и разделяется на две цепи. Одна цепь связывается в узком канале между доменами RuvC, HNH и CTD, а другая образует гетеродуплекс с sgRNA, который зажат между REC – и

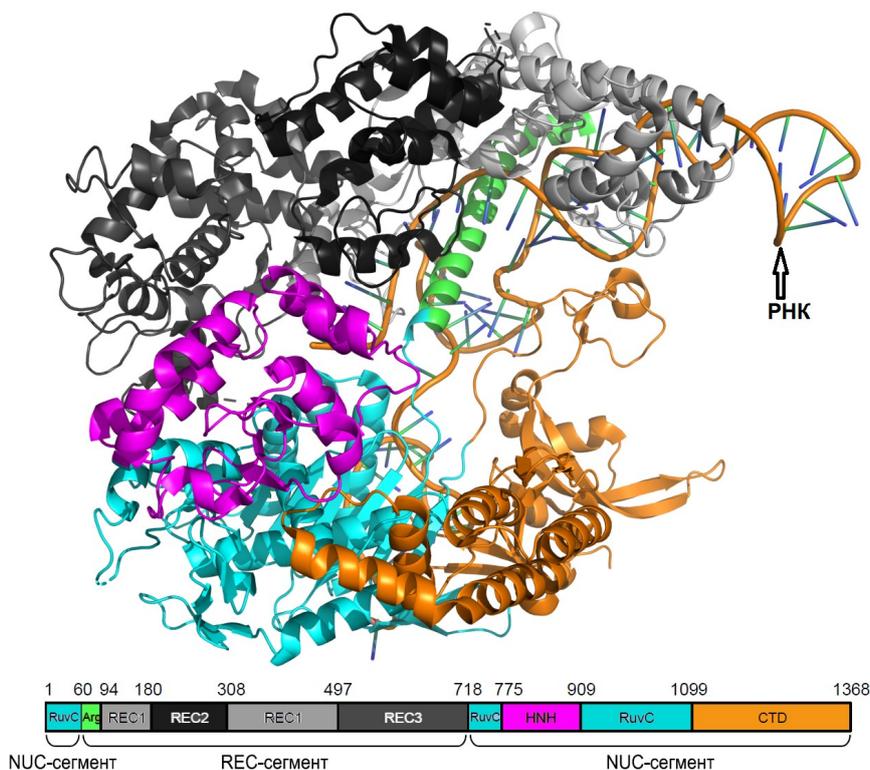


Рис. 2. Пространственная структура белка SpCas9 в комплексе с направляющей РНК (sgRNA) на основе данных PCA (PDB:4ZT9). Нижняя панель отражает доменную структуру белка SpCas9.

NUC – сегментами. Дуплекс ДНК после огибания с обеих сторон RuvC – и HNH – доменов восстанавливается за противоположным от PAM концом протоспейсера [77, 78].

Для удобства генно-инженерных работ было предложено использовать единую направляющую sgРНК (рис. 3). На 5'-конце sgРНК находится её переменная часть (спейсер) длиной 20 нуклеотидов. На 3' – находится её конститутивная часть из 76 нуклеотидов, необходимая для соединения с белком Cas9. Нуклеотиды 21–41 в sgRNA являются частью природной crRNA, а оставшиеся – частью tracrRNA. Все части sgРНК связываются с соответствующими доменами Cas9, за исключением спейсера и нуклеотидов 29–59 образующих петлю за счет комплементарных связей между повтором и антиповтором, которая выступает из белковой глобулы [73].

сам Cas9 взаимодействуя с сахарофосфатным остовом в затравочной части неадресуемой цепи стабилизирует цепь ДНК в расплавленном состоянии [81]. При этом образуется гетеродуплекс ДНК и протоспейсера РНК, причём его стабильность критически важна для определения целевой последовательности. Если последовательность ДНК и sgRNA не соответствуют друг другу на участке первых восьми нуклеотидов от PAM, то связывание протоспейсера с ДНК не происходит и комплекс Cas9 – sgRNA не связывается с молекулой ДНК. Однако, если образуются неспецифические связи, то образование гетеродуплекса при помощи протоспейсера всё-таки происходит. Этим и объясняются нецелевые эффекты (*off-target effects*) при редактировании геномов. После образования гетеродуплекса происходят дальнейшие пространственные перестройки в молекуле Cas9 и фермент активируется. Интересно, что каталитическая стадия гидролиза фосфодиэфирных связей остаётся малоизученной. Известно только, что после образования полного гетеродуплекса HNH-домен достигает стабильной конформации, что приводит к значительным конформационным сдвигам линкеров, направляющих не адресуемую цепь для расщепления в каталитический центр RuvC [82]. После гидролиза неадресуемая цепь продолжает деградацию по экзонуклеазному механизму в направлении 3'→5', а адресуемая цепь деградирует [73]. Далее Cas9 остаётся связанным с расщеплённой ДНК до вытеснения другими клеточными ферментами, например, ДНК- или РНК-полимеразами. Далее двуцепочечные разрывы (DSB, **D**ouble **S**trand **B**reaks) могут репарироваться по двум механизмам: 1) в случае негомологичного соединения концов (**N**on-**H**omologous **E**nd **J**oining, NHEJ) в месте разрыва могут возникать делеции или вставки нуклеотидов, 2) в случае гомологичной рекомбинации (**H**omologous **R**ecombination, HR) при введении донорной ДНК, фланкированной гомологичными последовательностями, в месте разрыва возможна вставка целевого гена.

Экспрессия нуклеазы Cas9

для геномного редактирования мицелиальных грибов

Экспрессия нуклеазы Cas9 – важный этап оптимизации системы CRISPR / Cas для редактирования мицелиальных грибов. Первым шагом в адаптации SpCas9 к экспрессии в грибах является оптимизация кодонов гена *spCas9* с учетом частоты использования кодонов в грибах [61, 83]. Также важен выбор сигнала ядерной локализации (NLS, **N**uclear **L**ocalization **S**equences). Для большинства грибов в качестве NLS может быть выбран стандартный сигнал SV40 [61],

однако, для грибов *Fusarium oxysporum*, например, стандартный NLS не подходит и в данном случае используются гомологичные NLS [84].

Чтобы детектировать экспрессию и внутриклеточную локализацию оптимизированного Cas9, большинство исследователей используют фьюжн-конструкции, состоящие из Cas9 белка и зеленого флюоресцентного белка eGFP. Детектирование ядерной или цитозольной локализации Cas9 ведут с помощью флюоресцентной микроскопии [84–87].

Эффективная экспрессия Cas9 также сильно зависит от используемого промотора. Наиболее часто используются конститутивные промоторы, поскольку экспрессия гетерологичных генов под их контролем стабильна и не зависит от индукции. В мицелиальных грибах для конститутивной экспрессии Cas9 используют 3 основных промотора: промотор *trpC* гена синтеза триптофана в *A. nidulans*, промотор *gpdA* гена глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы *A. nidulans* и *P. verruculosum*, и TEF1 промотор α -субъединицы фактора элонгации трансляции 1 *A. nidulans* [61, 88–89]. Менее популярными, однако также используемыми для экспрессии Cas9 в грибах, являются промоторы: *xlnA*, *Ham34*, *amyB*, *niiA*, *Otef* и *hsp70* [90–93]. Следует отметить, что экспрессия Cas9 как гетерологичного белка может быть токсичной для реципиентных штаммов, поэтому крайне важно изучать влияние экспрессии нуклеазы на стандартные морфологические и физиологические параметры: рост и развитие штамма, спорогенез, стресс-устойчивость, вирулентность и т.д. каждый раз при адаптации метода CRISPR / Cas для конкретного штамма мицелиального гриба [87, 94–96]. Данные о вариантах экспрессии Cas9 собраны в таблице.

Применение в геномном редактировании ортологов *SpCas9* и других Cas-белков

Повсеместное использование белка SpCas9 связано с приоритетом обнаружения данной нуклеазы среди нуклеаз второго класса. Несмотря на то, что белок SpCas9 уже довольно хорошо изучен и широко применяется в геномном редактировании, продолжается поиск новых эффекторных белков. Многие ортологи Cas9 превосходят SpCas9 по свойствам. Например, белки *Streptococcus thermophiles* (StCas9) *Neisseria meningitidis* (NmeCas9) имеют большую специфичность, а ген Cas9 из *Staphylococcus aureus* меньший размер, что дает преимущества при доставке гена в клетку редактируемого организма. Кроме того, ортологи Cas9 имеют разные последовательности PAM, что позволяет проводить редактирование в разных местах на цепи ДНК и в некоторых случаях уменьшить количество нецелевых делеций в геноме [97].

Наряду с белками Cas9 широкое применение нашёл белок Cas12a или Cpf1 из *Franciella novicida*, относящийся к CRISPR-Cas системе V типа второго класса. К его преимуществам относится, во-первых, меньший размер белка (1300 аминокислотных остатков против 1629 у SpCas9) и sgRNA (40 нуклеотидов против 100 у sgRNA для SpCas9). Во-вторых, PAM у Cpf1 находится с 5'-конца от протоспейсера и имеет последовательность 5'-TTN-3', что расширяет возможности метода в целом. Также расщепление нецелевой цепи происходит после восемнадцатого нуклеотида от PAM, а на целевой – после двадцать третьего, то есть с образованием «липких концов» с выступающими 5'-концами [98]. В 2017 году вышла первая статья об успешном редактировании дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* с использованием Cpf1 [99], что подтверждает перспективность использования данного белка в геномном редактировании дрожжей и грибов.

Cas13a, РНК-рибонуклеаза CRISPR-Cas типа VI-A, управляемая РНК-рибонуклеазой, еще один фермент, разрушающий инвазивные/вирусные РНК, на которые нацелена crRNA [100]. Для Cas13a из *Lepidotrichia buccalis* была решена кристаллическая структура и определен механизм действия. Показано, что Cas13a сохраняется в неактивном состоянии в отсутствие вирусных РНК, комплементарных направляющей области. Однако, когда фаг атакует хозяина, и направляющая область crRNA образует дуплекс РНК-направляющей-мишенью, Cas13a переключается в каталитически активное состояние и хаотично расщепляет любые, как коллатеральные, так и одноцепочечные РНК-мишени, свободно экспонируемые ssRNA. Проведенные исследования показывают, как Cas13a системы CRISPR-Cas типа VI защищаются от РНК-фагов, и создают основу для его развития в качестве инструмента для манипуляции с РНК.

Экспрессия sgRNA

Использование промоторов РНК полимеразы III. sgRNA в системе CRISPR / Cas9 не содержит кэп-структуры и поли(А)-хвоста и требует четкой начальной точки транскрипции. В большинстве случаев sgRNA управляется промоторами U6 РНК-полимеразы типа III, которые обеспечивают устойчивую транскрипцию [101]. Чтобы исследовать возможность использования U6 промотора в мицелиальных грибах, было проведено сравнение последовательностей snRNA (малых ядерных РНК) из различных организмов от дрожжей до человека. Биоинформатический анализ показал высокую гомологию (65%) последовательностей snRNA U6 среди всех эукариот [91]. Идентифицированные промоторы U6 успешно транскрибировали sgRNA и направляли Cas9 к месту двухцепочечного разрыва ДНК [92, 94].

Помимо промотора *U6*, в работе [93] протестирована эффективность работы системы CRISPR / Cas9, управляемой промотором *tRNA* (*ptRNA*Leu-TAA, *ptRNA*GlyGCC, *ptRNA*TyrGTA и *ptRNA*GlyTCC). Четыре *tRNA* промотора имели большую эффективность, чем *U6* промотор, что означало возможность их использования в системах альтернативной экспрессии [102].

Поиски еще более эффективного промотора привели к обнаружению высоко консервативного участка гена *5S rRNA*. Использование определенного участка *5S rRNA* и области размером 338 п.о., направленной в сторону 5'-конца, используемых в качестве промотора sgRNA, привело к увеличению эффективности разрыва гена до 96%, в то время как использование *U6* промотора не позволяет преодолеть барьер эффективности метода в 25% [103].

Использование промоторов РНК полимеразы II. Использование промоторов *U6* или *U3* имеет ряд ограничений. Во-первых, *snРНК U6* и *snРНК U3* являются конститутивными генами и, как правило, экспрессируются во всех типах клеток, а, следовательно, не могут быть использованы для тканеспецифичной sgRNA. Во-вторых, промоторы *U6* и *U3* не подходят для транскрипции sgRNA *in vitro*, поскольку РНК – полимеразы III коммерчески недоступны. Кроме того, использование промоторов *U6* и *U3*, ограничивает возможные варианты спейсеров до последовательностей G (N) 20GG и A (N) 20GG соответственно [101, 104].

Вышеперечисленные ограничения могут быть сняты при использовании рибозимов, молекул РНК, обладающих каталитической активностью. В работе [102] для дизайна кассеты рибозим – sgRNA – рибозим использовалась нуклеазная активность рибозимов 5'-НН (от англ. **H**ammer**H**ead) и 3' – HDV (**H**epatitis **D** **V**irus). Данная конструкция была введена в клетки дрожжей под контролем *ADHI* промотора, транскрибируемого РНК-полимеразой II. Показано, что такая система не лимитирована наличием последовательностей G (N) 20GG и A (N) 20GG. Впоследствии была получена аналогичная конструкция под контролем сильного конститутивного промотора *gpdA* и терминатора *trpC* и успешно применена в штаммах *Aspergillus* [83].

Однако вышеупомянутые методы относительно сложны и технически трудны в реализации, а также могут вносить дополнительные вещества в клетки, вызывающие токсические эффекты. Поэтому исследователями применяется еще один подход, в котором конструируется кассета microRNA-shRNA-sgRNA (miRsh-sgRNA), которая также регулируется промотором РНК-полимеразы II [105]. Было экспериментально доказано, что кассета miRsh-sgRNA эффективна в экспрессии gRNA. Эффективность кассеты miRsh-sgRNA транскрипция sgRNA была доказана при расщеплении гена *p53* [106].

Таким образом, промотор РНК-полимеразы II позволит в будущем более контролируемое и безопасное редактирование генов, и в том числе геномов мицелиальных грибов, с помощью системы CRISPR / Cas9.

III СТРАТЕГИЯ ПРИМЕНЕНИЯ СИСТЕМЫ CRISPR-Cas В ГЕНОМНОМ РЕДАКТИРОВАНИИ МИЦЕЛИАЛЬНЫХ ГРИБОВ

Процедура редактирования генома системой CRISPR-Cas состоит из следующих этапов: 1). Выбор гена или другого локуса в геномной ДНК, в котором необходимо провести редактирование; 2). Подбор варианта селекции; 3). Подбор последовательности спейсера под редактируемый ген; 4). Клонирование sgRNA с подобранным спейсером; 5) Доставка системы в редактируемый организм (клетку); 5) Отбор рекомбинантных клонов.

Первый этап индивидуален для каждого эксперимента и зависит от его целей. Единственным условием является наличие известной нуклеотидной последовательности, для редактируемой области ДНК. Фактически, на сегодняшний момент лишь несколько работ посвящены редактированию геномов с целью метаболической инженерии, большинство же проведенных исследований, в основном, касается адаптации системы CRISPR / Cas9 для мицелиальных грибов [107].

ПОДБОР ВАРИАНТА СЕЛЕКЦИИ

Для того, чтобы быстро и просто детектировать эффективность работы системы CRISPR / Cas9, исследователи предпочитают вносить изменения в функциональные гены, меняя фенотипические признаки штаммов (Таблица 1). Например, в работе [92] в качестве генов-мишеней для исследования экспрессии промоторов *snRNA U6* в системе CRISPR / Cas9 были выбраны *wA* и *uA*, делеция которых приводит к образованию окрашенных конидий. Аналогичный подход был применен для грибов рода *Aspergillus* [61,83, 108], *Trichoderma* [109], *Talaromyces atrovirens* [110], *Penicillium subrubescens* [111], *Magnaporthe oryzae* [112] и др. (таблица).

Особое внимание при адаптации CRISPR-Cas системы уделяется выбору подходящих эффективных селекционных маркеров. Гены устойчивости, такие как *hph* (устойчивость к гигромицину В), *ble* (устойчивость к блеомицину), *bar* (устойчивость к биалафосу) и G418 (устойчивость к генетицину), были успешно использованы для отбора

положительных штаммов. Например, трансформанты *Aspergillus* [61], *N. crassa* [88], *Myceliophthora* [113], были получены на среде, содержащей биалафос. В работах [114] и [61] была показана возможность отбора трансформантов на селективных средах с блеомицином. Антибиотик G418 также может использоваться для скрининга положительных трансформантов гриба *Phytophthora sojae* [115]. Гигромицин В – широко известный селективный маркер используется для скрининга мицелиальных грибов, включая *A. fumigatus* [114], *A. niger* [116], *A. carbonarius* [117], *Alternaria alternata* [118] и *Shiraia bambusicola* [95].

Оротидин-5'-фосфатдекарбоксилаза, P_{yr}G, участвует в биосинтезе уридина, а также является мишенью для 5-фтороротовой кислоты (5-FOA). На основании этого свойства ауксотрофный мутант P_{yr}G, устойчивый к 5-FOA, применяется в *A. oryzae*, *T. reesei*, *A. fumigatus* [109, 91, 119, 120]. Маркер *amdS*, кодирующий ацетамидазу, приводит к росту положительных трансформантов *P. chrysogenum* на среде, содержащей ацетамид в качестве источника азота или углерода [90].

Однако разнообразие селекционных маркеров не безгранично, что связано с индивидуальными особенностями метаболизма мицелиальных грибов, поэтому на практике часто используют фаговую Cre-рекомбиназу для восстановления маркеров селекции, что позволяет использовать один и тот же маркер селекции для скрининга положительных клонов. В работе [121] была разработана методика одноэтапной безмаркерной генетической модификации промышленных эукариотических микроорганизмов с использованием системы CRISPR / Cas9 на основе Cre / loxP. Целевой ген нокаутируется или удаляется системой CRISPR / Cas9, а Cre-рекомбиназа индуцируется светом и затем может удалять маркеры селекции, такие как гигромицин В, фосфинотрицин или хлоримуронэтил, что гарантирует, что тот же маркер может быть использован для последующих генетических манипуляций. Система CRISPR / Cas9 на основе Cre / loxP была успешно применена в *Hypocrea jecorina* (*T. reesei*) Qm6a, *N. crassa*, *A. niger* и *Metarhizium anisopliae* [120]. Систему CRISPR / Cas9 на основе Cre / loxP можно использовать для одновременного удаления нескольких кластеров генов на основе обратимого преобразования автотрофов и ауксотрофов.

ПОДБОР ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ СПЕЙСЕРА
И КЛОНИРОВАНИЕ sgRNA

Подбор последовательности спейсера является самым важным этапом. От его правильного подбора зависит не только эффективность редактирования целевого сайта, но и вероятность срабатывания системы на нецелевых участках (*off-target effect*). Как правило, специфичный спейсер должен соответствовать следующим условиям: не образовывать вторичных структур (хотя в некоторых работах специально использовался спейсер со шпилькой на 5'-конце для уменьшения *off-target* активности [122]), содержание гуаниновых и цитозиновых оснований должно составлять от 35 до 75 %, спейсер не должен содержать поли-(Т)-последовательностей (при использовании транскрипции sgRNA РНК-полимеразой III, так как поли-(Т)-последовательность является для неё терминирующим сигналом), *off-target* сайты должны содержать не менее трёх неспаренных оснований и, желательно, ближе к 3'-концу. В настоящее время, для подбора последовательностей спейсеров используются специальные программы, многие из которых, находятся в открытом доступе (E-CRISP: <http://www.e-crisp.org/E-CRISP/>, ЧОПЧОП: <https://chopchop.cbu.uib.no/>, CRISPRdirect: <https://crispr.dbcls.jp/>). Данные программы используют различные алгоритмы оценки целевой специфичности спейсера, а также проводят поиск возможных *off-target* сайтов в редактируемом геноме [123].

Клонирование sgRNA с подобранным спейсером является чисто технической задачей. Ее решение является необходимым этапом в эксперименте с использованием CRISPR/Cas. Применяется несколько вариантов решения этой задачи, как с помощью клонирования, так и с помощью ПЦР, однако перечисление всех методик выходит за рамки данного обзора». Как правило, применяется 2-этапная методика, включающая отжиг 2-х олигонуклеотидов с «липкими» концами, соответствующих последовательности спейсера, друг на друге с последующим лигированием их в плазмиду, гидролизованную между промотором и последовательностью sgRNA рестриктазой IIS класса, например, *BbsI*, с образованием «липких» не комплементарных концов [103]. Данная схема универсальна и позволяет быстро заменять протоспейсеры для обеспечения редактирования генома конкретного мицелиального гриба.

ДОСТАВКА СИСТЕМЫ CRISPR/Cas В КЛЕТКУ

Доставка системы CRISPR/Cas является наиболее вариативным этапом в адаптации к мицелиальным грибам. Доставить систему в клетку можно по различным схемам, т. е. как в виде ДНК и последующей сборкой системы *in vivo* или в виде собранного комплекса *in vitro*, так и в промежуточном состоянии, т. е. всю систему в виде синтезированной *in vitro* РНК или только sgRNA, а сам белок Cas9 в виде ДНК. Каждый способ имеет свои преимущества и недостатки, но выбор той или иной схемы прежде всего зависит от вида организма и возможностей лаборатории.

Обычно экспрессионные кассеты с Cas9 и sgRNA переносятся в клетку редактируемого микроорганизма либо единым вектором либо двумя различными векторами (Таблиц 1). В работе Жанга с соавт. [91] была исследована эффективность двух различных методов доставки на модельном грибе *A. fumigatus*. Было показано, что доставка Cas9 и sgRNA с использованием одновекторной системы значительно эффективнее, чем трансформация гриба двумя различными векторами, что скорее всего связано с невозможностью контроля точного соотношения экспрессионных кассет с Cas9 и sgRNA.

Наиболее используемым вариантом доставки на сегодняшний момент является поэтапное введение Cas9 и sgRNA. На первом этапе реципиентный штамм гриба стабильно трансформируется кассетой с Cas9 и проводится скрининг на положительную экспрессию нуклеазы. На втором этапе Cas9-положительные клетки трансформируют транскрибированной sgRNA *in vitro* [85, 109, 116, 124]. Трансформация полиэтиленгликолем (PEG) и трансформация с помощью *Agrobacterium* (АМТ), являются двумя наиболее распространенными методами трансформации систем CRISPR / Cas9 в клетки грибов. Однако, метод PEG-опосредованной трансформации является наиболее простым и наиболее предпочтителен для многих грибов [87, 125, 126]. Тем не менее, пролонгированная экспрессия Cas9 может быть токсичной для клеток грибов и усиливать *off-target* эффекты, которые может быть трудно обнаружить [62]. Кроме того, использование плазмид для экспрессии Cas9 и sgRNA также может вызывать случайную интеграцию плазмидной ДНК в геном хозяина.

Доставка собранного *in vitro* комплекса Cas9:sgRNA позволяет проводить редактирование без встраивания в геном генов *Cas9* и *sgRNA*, что уменьшает вероятность неспецифического редактирования за счёт непродолжительного времени существования комплекса и позволяет сохранить геном «чистым». В работе [90] было показано, что доставка уже очищенного рекомбинантного белка Cas9 и sgRNA

в клетки генерирует в два раза больше рекомбинантных колоний для гриба *P. chrysogenum*, чем трансформация единой плазмиды с Cas9 и sgRNA, что снижает относительную токсичность и *off-target* эффекты, а также улучшает сайт-специфичность вводимых мутаций. В этих же исследованиях было продемонстрировано, что использование синхронизации клеточного цикла и своевременной доставки рибонуклеопротеиновых комплексов Cas9 (RNP, **R**ibo**N**ucleo**P**rotein) является простым и эффективным методом улучшения сайт-специфического редактирования генома *P. chrysogenum* [90]. Подобные методы были использованы для грибов *T. reesei* [127] и *A. niger* [128]. Однако доставка рибонуклеопротеинового комплекса в грибную клетку довольно сложна и пока редко используется на мицелиальных грибах.

При работе с мицелиальными грибами наиболее часто используют доставку генов *Cas9* и *sgRNA* в виде ДНК интегрируя в геном или в составе плазмиды с последовательностью AMA1, что позволяет поддерживать её автономную репликацию в селективных условиях [61, 91, 108, 110, 111, 118, 129, 130]. При этом зачастую возникают сложности с транскрипцией гена направляющей-РНК, поскольку обычно для этого используют промотор РНК-полимеразы III, однако для многих видов мицелиальных грибов промоторы РНК-полимеразы III не известны. Поэтому исследователям приходится использовать промоторы РНК-полимеразы II с добавлением рибозимов по флангам направляющей-РНК [83, 110, 111, 118, 119, 129–132] или консервативный промотор *5S pPHK*, которая транскрибируется РНК-полимеразой III [103]. Избежать проблем с транскрипцией sgRNA можно также транскрибируя её *in vitro*. Однако в таком случае необходимо получить штамм, экспрессирующий базовый ген *Cas9* [109].

Как говорилось выше, первоначальный отбор отредактированных клонов обычно проводят по фенотипу или способности расти на селективной среде. Тем не менее, для практических целей необходимо проводить редактирование генов, нокаут которых никак не проявляется фенотипически. В таком случае в место разрыва вносят маркерный ген за счёт гомологичной рекомбинации, однако в любом случае после первичного фенотипического или селективного отбора проводят секвенирование участка ДНК, на котором проводилось редактирование, а в случае одновременного редактирования по нескольким сайтам, секвенирование является единственным достоверным способом оценить эффективность применения системы CRISPR/Cas.

IV ПРИМЕРЫ ГЕНОМНОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ МИЦЕЛИАЛЬНЫХ ГРИБОВ

ГЕНОМНОЕ РЕДАКТИРОВАНИЕ ГРИБОВ РОДА *TRICHODERMA*

В мировой практике *T. reesei* является основным источником целлюлолитических коммерческих ферментных препаратов, а также *T. reesei* может быть использована как платформа для продукции гетерологичных ферментов. Первый успешный опыт применения CRISPR / Cas9 был связан с нокаутом генов *lae1*, *vib1* и *clr2*, которые регулируют экспрессию целлюлазных генов. На первых стадиях адаптации системы CRISPR / Cas9 была проведена оптимизация кодонов гена *Cas9* *S. pyogenes*, который был соединен с NLS SV40. Оптимизированный ген *Cas9* был предварительно интегрирован в геном *T. reesei* под контролем конститутивного промотора пируват декарбоксилазы (Ppdc) или индуцибельного промотора целлобиогидролазы (Pcbh). Полученные штаммы трансформировались синтезированной *in vitro* sgRNA со спейсером для целевого гена. Одновременно проводился нокаут маркерного гена *ura5*, отключение которого приводило к выживаемости трансформантов на среде с 5'-фтороротовой кислотой. Авторами было показано, что эффективность нокаутов значительно повышается при использовании фрагментов донорной ДНК с фланкирующими последовательностями длиной в 200 п.н. и более. Показано, что репарация по механизму NHEJ проходит эффективнее, чем HR [109].

В работе [133] для нокаута гена *sxlR*, негативного транскрипционного фактора регуляции активности ксиланазы, в геноме *T. reesei* также была успешно применена методика, использованная в работе [109].

В работе [120] для внуклеточной транскрипции sgRNA были клонированы 2 варианта промоторных участков, соответствующих промотору *U6*. Была сконструирована sgRNA с протоспейсером к маркерному гену *ura5*. Трансформация проводилась методом АМТ в штамм *T. reesei* с базовой экспрессией Cas9. Показано, что эффективность геномного редактирования составляла в данном случае лишь 8–10 %.

В статье [127] для одновременного делетирования генов целлобиогидролазы 2 (*cbh2*), эндоглюконазы 1 (*egl1*) и эндоглюконазы 2 (*egl2*) был использован подход с применением нуклеопротеина. Авторами проводилась трансформация протопластов *T. reesei* собранным *in vitro* комплексом Cas9:crRNA, т. е. использовалась не *in vitro* транскрипция sgRNA, а нативный дуплекс crRNA и tracrRNA. Для трансформации был взят штамм *T. reesei* с мутацией в гене *pyr4* и

делецией гена лигазы *mus53* для улучшения гомологичной рекомбинации. Делетирование выбранных генов проводилось одновременно с использованием эквимольного количества crRNA с разными протоспейсерами, причём на каждый ген использовалось по две crRNA, нацеленных на их начало и конец. Вырезанные участки генома замещались добавляемыми при трансформации донорными ДНК-фрагментами с геном *pur4* фланкированными с 5'- и 3'-концов участками гомологичными геномной ДНК размером 1000 п.н. В результате было получено 16 колоний с тройной делецией из 139 полученных после трансформации, что соответствует 12%. После апробации тройной делеции по такой же схеме был повторён эксперимент с использованием в качестве донорных молекул ДНК кассет с искусственными экспрессионными системами SES (**S**ynthetic **E**xpression **S**ystem) с геном липазы *calB* из *Candida antarctica*. В результате был получен штамм, продуцирующий препарат липазы *calB* с низким содержанием нецелевых белков по сравнению со стандартной экспрессией с использованием *cbh1* промотора и удельной активностью в 1,5 раз больше, чем в стандартном препарате [127].

ГЕНОМНОЕ РЕДАКТИРОВАНИЕ ГРИБОВ РОДА *ASPERGILLUS*

Многие виды мицелиальных грибов рода *Aspergillus* нашли широкое применение в биотехнологии. Они используются для переработки отходов биомассы, производства органических кислот, производстве алкогольных напитков и других биотехнологических процессах. В тоже время некоторые аспергиллы образуют микотоксины и являются возбудителями заболеваний человека и животных.

В работе, опубликованной в 2015 году, группой датских учёных под руководством Уффе Мортенсена система CRISPR-Cas была адаптирована для редактирования сразу 6-ти видов грибов рода *Aspergillus*: *A. aculeatus*, *A. brasiliensis*, *A. carbonarius*, *A. lichuensis*, *A. nidulans* и *A. niger* [61]. Исследователями была выбрана схема доставки системы CRISPR-Cas в клетку в виде соответствующих генов в составе единой плазмиды. Для возможности её применения на различных видах были получены 4 варианта плазмиды с разными маркерными генами, обычно используемыми для мицелиальных грибов: *AFUM_pyrG*, *AN_argB*, *ble^R* или *hyg^R*, также она содержала последовательность AMA1, для поддержания репликации. Для экспрессии оптимизированного гена *SpCas9* под *A. niger* с сигналом внутриядерной локализации вируса SV40 был использован сильный конститутивный промотор фактора элонгации трансляции 1 *A. niger* (*tef1*) и *tef1* терминатор. Для транскрипции sgRNA был выбран сильный конститутивный промотор глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы

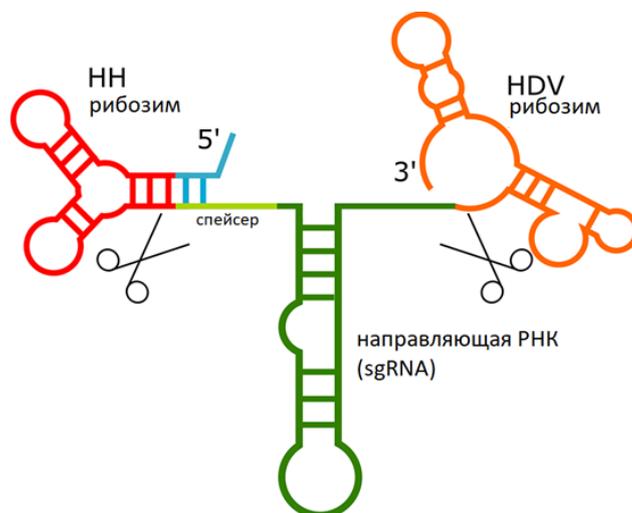


Рис. 4. Высвобождение sgRNA из транскрипта РНК-полимеразы II.

Направляющая РНК представлена в светло-зеленом и зеленом цвете, рибозимы НН и вируса гепатита D (HDV), показаны красным, синим и оранжевым, соответственно. Точки расщепления обозначены ножницами. Синяя часть НН гибридизуется с протоспейсером для эффективного расщепления. Рис. из ссылки [61] адаптирован к обзору.

A. niger (*gpdA*), а для терминирования транскрипции использовался терминатор гена *trpC*. Поскольку sgRNA не должна содержать кэп на 5'-конце и поли(А)-хвост на 3'-конце, её последовательность была фланкирована с 5'-конца последовательностью рибозима НН, а с 3'-конца – рибозимом HDV (рис. 4, таблица).

Собранная система была испытана с протоспейсером на ген *albA* на 5 видах грибах: *A. aculeatus*, *A. niger*, *A. carbonarius*, *A. luchuensis* и *A. brasiliensis*. Нокаут гена *albA* в мицелиальных грибах должен приводить к образованию белых колоний. В результате наибольшая эффективность редактирования наблюдалась у *A. brasiliensis* и *A. niger* (около 100%) и наименьшая у *A. luchuensis* (25%), что возможно связано с низкой выживаемостью рекомбинантов после трансформации. Также адаптированная CRISPR-Cas система проверялась с протоспейсером над ген *уА* на *A. nidulans* и протоспейсером на ген *purG* на *A. aculeatus* и также оказалась работоспособной. В заключении авторы отмечают, что эффективность адаптированной системы при геномном редактировании грибов одного рода и различных видов была различной, что, по их мнению, можно решить

Таблица. Структурные элементы системы CRISPR/Cas9 для геномного редактирования низших грибов

Микро-организм	sgRNA стратегия	Cas9 стратегия	Делетируемый признак/эффект	Эффективность редактирования	Ссылка
1	2	3	4	5	6
Редактирование геномов грибов рода <i>Aspergillus</i> sp.					
<i>A. aculeatus</i> <i>A. brasiliensis</i> <i>A. carbonarius</i> <i>A. ichuensis</i> <i>A. nidulans</i> <i>A. niger</i>	Экспрессия <i>in vivo</i> с одной автономно реплицирующейся плазмиды: AMA1-P <i>gpdA</i> -HH <i>gbozume</i> -sgRNA-HDV <i>gbozume</i> -T <i>trpC</i> -P <i>tef1</i> -Cas9-T <i>tef1</i> (NHEJ) Ген <i>Cas9</i> кодон-оптимизированный для <i>A. niger</i>		Δ <i>albA</i> /образование белых колоний Δ <i>uA</i> /изменение окраски конидий с зеленого на желтый Δ <i>ruuG</i> /рост на орто-фтороротовой кислоте	<i>A. brasiliensis</i> и <i>A. niger</i> – 100% <i>A. ichuensis</i> – 25% <i>A. nidulans</i> – 90% <i>A. aculeatus</i> – 80%	[6], [83]
<i>A. oryzae</i>	Экспрессия <i>in vivo</i> с одной плазмиды: P <i>amyB</i> -FLAG-NLS-Cas9-NLS-T <i>amyB</i> -PU6-sgRNA-TU6- <i>niaD</i> Ген <i>Cas9</i> кодон-оптимизированный для <i>A. oryzae</i>		Δ <i>wA</i> /зеленая-белая окраска конидий Δ <i>uA</i> /зеленая-желтая окраска конидий	10%	[92]
<i>A. oryzae</i>	Экспрессия <i>in vivo</i> с одной автономно реплицирующейся плазмиды: PU6-sgRNA-TU6-AMA1-P <i>amyB</i> -FLAG-NLS-Cas9-NLS-T <i>amyB</i>		Δ <i>uA</i> /зеленая-белая окраска конидий Δ <i>uA</i> /зеленая-желтая окраска конидий Δ <i>ruuG</i> /рост на орто-фтороротовой кислоте	55,6–100%	[134]
<i>A. fumigatis</i>	Интеграция в геном в составе единой кассеты: T <i>trpC</i> - <i>hph</i> -P <i>gpdA</i> -P <i>tef1</i> -Cas9-SV40-NLS-P <i>urr52</i> -gRNA-T <i>sup4</i> (NHEJ) Ген <i>Cas9</i> кодон-оптимизированный для <i>Neurospora crassa</i>		Δ <i>rksP1</i> /черная-белая окраска	25–53%	[114]
<i>A. fumigatis</i>	Экспрессия <i>in vivo</i> с одной автономно реплицирующейся плазмиды: AMA1-PU6-sgRNA-P <i>gpdA</i> -Cas9-T <i>trpC</i> (MMEJ) Ген <i>Cas9</i> кодон-оптимизированный для <i>H. sapiens</i>		Δ <i>rksP1</i> /черная-белая окраска	95–100%	[91]

Продолжение табл. см. на сл. стр.

Продолжение табл.

1	2	3	4	5	6
<i>A. niger</i>	Экспрессия <i>in vivo</i> с одной автономно реплицирующейся плазмиды: AMA1- <i>Ptef1</i> -AROBEC1-XTEN linker-pCas9(D10A)-SGGS linker-UGI- <i>Ttef1</i> -Ubr-sgRNA. Использован редактирующий комплекс на основе pCas9(D10A) и цитидин дезаминазы		$\Delta rnrG$ /селекция на средах с орто-фторо-ортовой кислотой $\Delta fvbA$ /изменение цвета конидий с черных на белые	47–100%	[108]
<i>A. niger</i>	Интеграция в геном в составе единой кассеты: 1) <i>Pgln</i> -(HDV gibozyme-sgRNA)x4- <i>Tgln</i> - <i>Ptef1</i> -Cas9- <i>Ttef1</i> , 2) <i>PgpdA-amdS-gfpE1</i> -(HDV gibozyme-sgRNA)x4- <i>Trna2</i>		$\Delta 4$ протеаз/уровень продукции эритропозитина в вырост в 4,1,1 раза	Нет данных	[131]
<i>A. niger</i>	<i>In vitro</i> РНК-транскрипция HR; добавление донорной ДНК с маркерным <i>rnrG</i> геном	AMA1- <i>Ptef1</i> -Cas9- <i>hyg</i> - <i>Ttef1</i>	$\Delta 39114$ /увеличение выхода галактаровой кислоты в 4 раза	От 27 до 100% в зависимости от делетированного гена катаболизма галактаровой кислоты	[116]
	RNP комплекс + добавление донорной ДНК с маркерным <i>rnrG</i> геном Трансформация методом АМТ	Cas9, tracrRNA/crRNA- коммерчески доступны	$\Delta galX$ /увеличение выхода галактарата на 60%	100%	[128]
<i>A. niger</i> G1 (<i>amdS</i> -, $\Delta galA$, $\Delta prepA$)	P55rRNA-HDV gibozyme-sgRNA-6T	<i>PgalA</i> -NLS-Cas9-NLS- <i>TgalA</i> Ген <i>Cas9</i> кодон-оптимизированный для <i>A. niger</i>	$\Delta albA$ /образование белых колоний	100%	[103]
Редактирование геномов грибов рода <i>Trichoderma</i> sp.					
<i>T. reesei</i> Qm6A, <i>T. reesei</i> Rut-C30	<i>In vitro</i> РНК-транскрипция. В случае HR- добавление донорной ДНК с маркерным <i>ura5</i> геном.	Предварительная интеграция в геном в составе кассет: <i>Ppdc</i> -Cas9-eGFP- <i>Ppdc</i> <i>Pcbh1</i> -Cas9-eGFP- <i>Ppdc</i> Ген <i>Cas9</i> кодон-оптимизированный для <i>T. reesei</i>	$\Delta ura5$ /средах с орто-фторо-ортовой кислотой (NHEJ) $\Delta lae1$ (HR) $\Delta vib1$ (HR) $\Delta clr2$ (HR) $\Delta lae1/vib1$ (HR) $\Delta lae1/vib1/clr2$ (HR)	100% Единичные мутанты: 80–90% Двойной мутант: 45% Тройной мутант: 4,2%	[109]

Продолжение табл. см. на сл. стр.

Продолжение табл.

1	2	3	4	5	6
<i>T. reesei</i> Qm6A	<i>In vitro</i> РНК-транскрипция. В случае HR- добавление донорной ДНК с геном <i>sx1r</i> и <i>ira5</i> . Трансформация по ПЭГ/CaCl ₂ методике.	Предварительная интеграция в геном в составе кассеты: <i>RpdC-Cas9-TpdC</i> (штамм из [109]).	Δ <i>sx1r</i> / селекция на средах с 1% глюкозой	Нет данных	[133]
<i>T. reesei</i>	PU61-sgRNA- <i>ira5</i> PU62-sgRNA- <i>ira5</i> Трансформация методом АМТ	Предварительная интеграция в геном в составе кассеты: <i>RpdC-Cas9-sGFP-TpdC</i> . Ген <i>Cas9</i> кодон-оптимизированный для <i>T. reesei</i> .	Δ <i>ira5</i> / селекция на средах с орто-фтороротовой кислотой (NHFL)	8–10%	[120]
<i>T. reesei</i> QM9414 (<i>Друж-4</i> Δ <i>mus53</i>)	<i>In vitro</i> Cas9-crRNA Этап 1: HR- добавление донорной ДНК с маркерным <i>ruv4</i> геном Этап 2: HR- добавление кассеты <i>SES-cbh1-calB</i> в качестве донорной ДНК		Δ <i>cbh2</i> Δ <i>egl1</i> Δ <i>egl2</i> Δ <i>cbh2/egl1</i> Δ <i>cbh2/egl2</i> Δ <i>egl1/egl2</i> Δ <i>cbh2/egl1/egl2</i>	Единичные мутанты: 19–23% Двойные мутанты: 6–11% Тройной мутант: 12%	[127]
Редактирование геномов рода <i>Penicillium</i> (<i>Talaromyces</i>)					
<i>P. crustogenum</i>	<i>In vitro</i> РНК-транскрипция. Донорная ДНК с <i>amdS</i> геном.	<i>Rxy1-Cas9-Txy1-PgpdA- amdS-Tat-AMA1</i>	<i>Arks17</i> /зеленая-белая окраска	33–100%	[90]
<i>T. atrovirens</i>	Экспрессия <i>in vivo</i> с одной автономно реплицирующейся плазмиды: <i>AMA1-PgpdA-HH gbozyme-sgRNA-HDV gbozyme-TtrpC-Ptefl-Cas9-Ttefl</i> . Ген <i>Cas9</i> кодон-оптимизированный для <i>A. niger</i> .		Δ <i>albA</i> /зеленая-белая окраска	Нет данных	[110]
<i>P. sububescens</i>	Экспрессия <i>in vivo</i> с одной автономно реплицирующейся плазмиды: <i>AMA1-PgpdA-HH gbozyme-sgRNA-HDV gbozyme-TtrpC-Ptefl-Cas9-Ttefl</i> . Ген <i>Cas9</i> кодон-оптимизированный для <i>A. niger</i> .		Δ <i>ku70</i> / повышение частоты гомологичной рекомбинации	17%	[111]

Окончание табл. см. на сл. стр.

Окончание табл.

1	2	3	4	5	6
<i>T. reesei</i>	Экспрессия <i>in vivo</i> с одной автономно реплицирующейся плазмиды: AMA1-PgpdA-HH gbozyme-sgRNA-HDV gbozyme-TrpC-Ptef1-Cas9-Tef1. Ген Cas9 кодон-оптимизированный для <i>A. niger</i> .		Δ <i>zebI</i> // изменение морфологии гиф на короткие и ветвящиеся	43%	[130]
Редактирование геномов грибов других родов					
<i>N. crassa</i>	Psmr52-sgRNA-Trp4	PtrpC-Cas9-SV40NLS-TrpC. Ген Cas9 кодон-оптимизированный для <i>H. sapiens</i> .	<i>bar1</i> /циклоспорин А	До 90%	[88]
<i>M. oryzae</i>	Интеграция в геном в составе единой кассеты: PU6-sgRNA-poly(U)-Pcbl1-FLAG-NLS-Cas9-T2A		Δ <i>dh1</i> черная-розовая окраска колоний	До 90%	[112]
<i>A. alternata</i>	Экспрессия <i>in vivo</i> с одной автономно реплицирующейся плазмиды: AMA1-PgpdA-HH gbozyme-sgRNA-HDV gbozyme-TrpC-Ptef1-Cas9-Tef1. Ген Cas9 кодон-оптимизированный для <i>A. niger</i> .		Δ <i>brm2</i> и Δ <i>pks</i> /потеря окраски колоний	25%	[118]
<i>A. chrysogenum</i>	PU6RNA-sgRNA АГМ-трансформация Донорная ДНК	PgpdA-Cas9-TrpC. Ген Cas9 кодон-оптимизированный под <i>A. fumigatis</i> .	Δ <i>vorB</i> /обесцвечивание культуральной жидкости	90%	[136]
<i>U. maydis</i>	Транзientная экспрессия с одной плазмиды: PU6-sgRNA-TU6-Ptef-NLS-Cas9-HA-NLS-PTOS Кодон-оптимизированный Cas9		Δ <i>bW2</i> или Δ <i>bE1</i> // потеря филаментов	70%	[94]
<i>F. graminearum</i>	Интеграция в геном в составе единой кассеты: Ptef7-HH gbozyme-gRNA-HDV gbozyme-TgpdA-PgpdA-Cas9-TTR14. Ген Cas9 кодон-оптимизированный для <i>F. graminearum</i>		Δ <i>FgOst1</i> , устойчивость к ДМСО и флюдиоксонилу	Нет данных	[132]

клонированием гомологичных промоторов для экспрессии Cas9 и sgRNA для каждого редактируемого гриба. Кроме того, проблемой при редактировании мицелиальных грибов рода *Aspergillus* являлась многоядерность протопластов, что опять же снижало эффективность геномного редактирования [61].

Ещё одним интересным примером использования геномного редактирования в метаболической инженерии является работа Ж. Куйванена с соавторами [116], где проводилось редактирование генома *A. niger* с целью получения продуцента галактаровой кислоты. Вначале авторами было проведено секвенирование транскриптома *A. niger* до, и через 5 ч и 18 ч культивирования на среде галактаровой кислотой с целью определения генов, участвующих в её катаболизме. В результате было выявлено 7 генов с увеличившимся количеством транскриптов. Далее 6 из 7-ми генов были последовательно нокаутированы с использованием системы CRISPR-Cas. Для этого исследуемый штамм трансформировался плазмидой, содержащей ген *Cas9*, последовательность *AMA1* и селективный маркер *hug* для поддержания плазмиды на гигромицине. Вместе с плазмидой добавлялись и синтезированные *in vitro* sgRNA по две на начало и конец целевого гена. В результате эффективность нокаутов составляла от 27 до 100 процентов в зависимости от делетируемого гена. Параллельно были проведены нокауты тех же генов с помощью делегационных кассет с плечами гомологии размером 1,5 т.п.н. и геном *purG*, взятым в качестве селективного маркера. Использование последнего метода показало значительно меньшую эффективность делеции (от 0 до 43%) по сравнению с использованием системы CRISPR-Cas [61].

В работе [128] для гриба *A. niger* была проведена адаптация системы CRISPR / Cas9, которая состояла в минимизации метода трансформации протопластов *A. niger* рибонуклеопротеиновым (RNP) комплексом Cas9::sgRNA *in vitro*. В результате методика трансформации была минимизирована для работы в 96-луночных микропланшетах вместо 15 мл пробирок. Это привело к заметной экономии материалов и времени. Также оптимизированный метод повысил эффективность делеции целевых генов до 100%. Было продемонстрировано, что метод также подходит и для мультиплексного редактирования генома с двумя или тремя геномными мишенями, что очень удобно для метаболической инженерии грибов. В результате был получен штамм *A. niger* с улучшенной способностью продуцировать галактарат.

Оригинальная работа К. Женг по поиску возможностей для *in vivo* экспрессии sgRNA в грибе *A. niger* была опубликована в 2018

[103]. В данной работе для транскрипции sgRNA были использованы различные промоторы: промотор человеческого гена *RNU6-1* (*PhU6*), гена *RNU6 A. niger* (*PanU6*), внутренний промотор *5S pPHK A. niger* с различными вариантами длины 5'-нетранскрибируемой последовательности (-338, -160, -106, -65, -35) и без неё. Поскольку при использовании внутреннего промотора *5S pPHK* её последовательность остаётся на 5'-конце транскрипта, был сконструирован и вариант содержащий последовательность рибозима HDV между 3'-концом *5S pPHK* и 5'-концом sgRNA. Для испытания эффективности выбранных промоторов штамм *A. niger* G1 (*amdS-*, *ΔglaA*, *ΔpepA*) был трансформирован плазмидой с оптимизированным геном *SpCas9* и плазмидами с sgRNA и протоспейсером на ген *alba*, контролируемые новыми промоторами. Нокаут гена *alba* приводит к нарушению синтеза пигмента меланина и образованию неокрашенных колоний. В результате промоторы *PhU6* и *PanU6* показали низкую эффективность (20% и менее от количества выросших трансформантов). Напротив, все варианты с промотором *5S pPHK* показали высокую эффективность (около 100% от числа выросших трансформантов). Стоит отметить, что наличие *5S pPHK* по данным авторов не только не снижало эффективность нокаутирования, но даже напротив, улучшало работу системы. Предполагается, что данный феномен можно объяснить защитой sgRNA от действия РНКаз с 5'-конца.

Следующие два примера демонстрируют возможность экспрессии CRISPR-Cas системы *in vivo* с одной автономно реплицирующейся плазмиды [108, 131]. В работе [108] система CRISPR / Cas9 была адаптирована к редактированию *A. niger* так, чтобы предотвратить потенциальную опасность, вызванную DSB. Для этого была разработана серия конструкций с модифицированным Cas9 и цитидиндезаминазой, которые преобразуют цитидин (C) в тимин (T) без DSB. В результате удалось инактивировать 2 фенотипических гена *pyrG* и *fwnA* с эффективностью 47,36–100%, и нефенотипический ген *priT* с эффективностью 60% [108].

Реальное биотехнологическое применение системы CRISPR / Cas9 к модификации рекомбинантного штамма *A. niger*, продуцента человеческого эритропоэтина [131]. В результате применения системы CRISPR/Cas9 в штамме *A. niger* rHuEPO были нокаутированы гены протеаз *vps*, *priT*, *algC* and *och1*, что позволило получить штамм без секреции протеиназ. В результате уровень секреции эритропоэтина вырос в 41 раз. Доставка компонентов системы осуществлялась в виде единой плазмиды с участком *AMA1*, которая была ранее разработана для грибов рода *Aspergillus* [61].

A. oryzae также относится к промышленным мицелиальным грибам, продуцирующим целлюлазу. В Японии *A. oryzae* является основным продуцентом для производства гомологичных и гетерологичных ферментов. В 2016 году Катаяма и др. [92] адаптировали метод CRISPR / Cas9 для мутагенеза *A. oryzae* с эффективностью 10%. Позже, чтобы повысить эффективность редактирования те же авторы использовали плазмиду, содержащую автономно реплицирующуюся последовательность AMA1, что привело к повышению эффективности редактирования *A. oryzae* до 50–100% [134]. Плазида AMA1 присутствовала в нескольких копиях штамм *A. oryzae*, тем самым увеличивая экспрессию Cas9 и sgRNA, и, в конечном счете, повышая эффективность мутации штамма *A. oryzae*.

Для *A. fumigatis* система CRISPR / Cas была адаптирована Фуллером в 2015 году [114] на примере делеции гена *pksP*, кодирующего поликетидсинтазу, ответственную за окрашивание конидий в черный цвет. Интеграция системы CRISPR / Cas в геном гриба проводилась единой кассетой. Cas9 был оптимизирован с использованием кодонов для *H. sapiens* и сцеплен с геном устойчивости к антибиотику гиромидину, *hph*. Эффективность редактирования составляла 25–35%. Низкая эффективность редактирования в данном случае объясняется использованием NHEJ, который может приводить к случайным вставкам [114].

В исследовании [91] была предпринята попытка создания высокоэффективной системы CRISPR-Cas для выполнения точной и эффективной интеграции в рамку считывания с или без вставки маркера с точностью примерно 95–100% с помощью очень коротких (примерно 35 п.н.) фланкирующих участков. Этот процесс назвали микрогомологически-опосредованное соединение концов (**M**icrohomology-**M**ediated **E**nd **J**oining, ММЕJ). На основе этой системы была достигнута эффективная и точная интеграция экзогенного GFP в предсказанный сайт без вставки маркера. Для фенотипической селекции использовался тот же, что и в работе [114] конидиальный ген меланина *pksP*. Экспрессия проводилась *in vivo* с использованием единой кассеты, разработанной в [61], на основе AMA.

ГЕНОМНОЕ РЕДАКТИРОВАНИЕ ГРИБОВ РОДА *PENICILLIUM*

Мицелиальный гриб *Penicillium chrysogenum* известен как продуцент β-лактамных антибиотиков и различных вторичных метаболитов. В статье [90] описано успешное редактирование генома данного вида с использованием CRISPR-Cas системы. Проверка работоспособности

системы CRISPR-Cas проводилась на гене поликетидсинтазы (*pks17*), нокаут которого приводит к нарушению образованию зелёного пигмента в спорах и позволяет проводить фенотипический отбор. Трансформация протопластов проводилась синтезированным *in vitro* комплексом Cas9-sgRNA и донорной ДНК с геном устойчивости к ацетамиду (*amdS*), фланкированному участкам длиной 1 т.п.н. от места гидролиза геномной ДНК. В качестве реципиента использовался штамм с нарушением гена *hdfA* для улучшения гомологичной рекомбинации. Корректное встраивание гена *amdS* подтверждалось секвенированием. Аналогично было проведено двойное нокаутирование генов *pks17* и *lovF* (гена дикетидсинтазы участвующей в синтезе ловастатиона) и его эффективность составила 50%. Кроме того, было показано, что для штамма *P. chrysogenum* с нарушенной системой негомологичной рекомбинации для успешного встраивания донорных молекул ДНК в целевые сайты при использовании CRISPR-Cas системы достаточно использовать гомологичные плечи длиной всего по 60 п.н. Помимо трансформации синтезированным *in vitro* комплексом Cas9-sgRNA исследователями был опробован метод трансформации протопластов линейными молекулами ДНК: одной с маркером *amdS* и другой содержащей участок *AMA1*, ген *Cas9* и последовательность sgRNA. По предположению исследователей эти молекулы должны были рекомбинировать *in vivo* за счёт гомологичных концов с образованием автономно реплицирующейся плазмиды. Селекция плазмиды осуществлялась на ацетамиде. Для транскрипции гена *Cas9* использовали промотор *xlnA*, индуцируемый ксилозой, а для транскрипции sgRNA были опробованы три варианта промоторов РНК-полимеразы III (*PtRAN-Met*, *PtRNA-Leu* и *PU6*). В результате оказалось, что все три промотора, использованных для транскрипции sgRNA обеспечивали достаточный уровень её синтеза для осуществления геномного редактирования. Однако, как отметили исследователи, после нескольких пассажей на среде без ацетамида, в некоторых клонах сохранялась устойчивость к нему, что свидетельствует о встраивании в геном маркерного гена. В заключении, исследователи, сравнивая редактирование генома *P. chrysogenum* с помощью синтезированного *in vitro* комплекса и экспрессией его компонентов при помощи плазмиды с *AMA1* последовательностью, пришли к выводу, что первый способ минимизирует *off-target* эффекты, тогда как второй вариант позволяет получить большее количество отредактированных трансформантов [90].

Хорошим примером применения системы CRISPR-Cas в обратной генетике является работа М. Нильсен с коллегами по изучению путей

синтеза вторичных метаболитов в мицелиальном грибе *Talaromyces atroroseus* [110]. *T. atroroseus* является продуцентом талароконволутина А и аналога талароконволутина В – вещества с обозначением ZG-1494α, которое является ингибитором фактора активации тромбоцитарной ацетилтрансферазы. Поскольку геном *T. atroroseus* был секвенирован, в работе была применена схема CRISPR-Cas, ранее адаптированная для *Aspergillus* [116]. Для этого использовалась донорная плаزمиды с геном устойчивости к гигромицину для гомологичной репарации в месте двуцепочечного разрыва цепи ДНК и три различные плазмиды с последовательностью *AMA1*, геном *Cas9* и последовательностью, кодирующей sgRNA, которые отличались последовательностями протоспейсеров. В качестве модельной мишени для оценки возможности применения системы CRISPR/Cas был выбран ген UA08_00425, предположительно кодирующий поликетидсинтазу, необходимую для окрашивания конидий в серый цвет. В результате были получены трансформанты, имеющие неокрашенные конидии, однако эффективность редактирования при использовании различных протоспейсеров отличалась в 10 раз. Далее исследователями были подобраны протоспейсеры для нокаутирования гена UA08_04451, который кодирует ортолог гена *ccsA*, необходимого для синтеза веществ структурно близких талароконволутину А и ZG-1494α у других грибов. В итоге, в клонах, имевших делеции гена UA08_04451 был нарушен и синтез талароконволутина А и ZG-1494α [110].

В 2020 году были опубликованы две работы, посвященные редактированию грибов *Penicillium subrubescens* [111] и *Talaromyces pinophilus* [130]. В обоих случаях к грибам применялась схема редактирования, разработанная для *Aspergillus* [83]. Нокаутом гена *ku70* в штамме *P. subrubescens* была повышена вероятность гомологичной рекомбинации при отсутствии изменения фенотипических признаков штамма. В работе приводятся доказательства нокаута гена *ku70*, однако сам факт увеличения частоты гомологичной рекомбинации не подтвержден [111].

Система CRISPR/Cas9 была также адаптирована и для известного продуцента карбогидраз *Talaromyces pinophilus*. В результате был нокаутирован ген *seb1*, что привело к изменению морфологии гиф на более короткие и ветвящиеся по сравнению с диким типом, что повысило уровень секреции ферментов на 10–15%. Кроме того, в культуральной жидкости мутантных штаммов наблюдалось повышение специфической активности целлюлаз по фильтровальной бумаге на 20–40% [130].

ГЕНОМНОЕ РЕДАКТИРОВАНИЕ МИЦЕЛИАЛЬНЫХ ГРИБОВ
ДРУГИХ РОДОВ

Как известно, помимо представителей родов *Aspergillus*, *Trichoderma* и *Penicillium* широкое применение в биотехнологии имеют и другие мицелиальные грибы, такие как *Acremonium chrysogenum*, например, промышленный продуцент цефалоспорина. Кроме того, существует широкая панель паразитарных грибов, таких как *Alternaria alternata*, *Magnaporthe oryzae*, *Fusarium graminearum*, методы борьбы с которыми требуют современных молекулярно-генетических подходов. Интересен гриб *Neurospora crassa*, который является удобным объектом для изучения грибной физиологии. В связи с этим к настоящему времени уже накоплен достаточный опыт и знания по редактированию представителей родов *Neurospora*, *Phytophthora*, *Mucor*, *Fusarium* и других [135].

В работе [88] с помощью технологии CRISPR/Cas в геноме *Neurospora crassa* был заменён индуцибельный промотер гена *clr2*, являющегося регулятором транскрипции генов целлюлаз, на конститутивный промотер гена β -тубулина. Замена привела к повышению экспрессии целлюлаз. При этом доставка sgРНК и нуклеазы Cas9 осуществлялась двумя отдельными плазмидами. Для транскрипции sgRNA использовался промотер *snr52* и терминатор *sup4*. Для транскрипции гуманизированного гена *Cas9* использовались промотер и терминатор гена *trpC*. Для замены промотерной области гена *clr2* вместе с компонентами редактирующего комплекса добавлялась донорная ДНК. При этом эффективность редактирования была довольно высокой и составляла 90% [88].

Для известного патогена зерновых культур *Fusarium graminearum* также было опробовано редактирование генома с помощью системы CRISPR/Cas. В качестве мишени для редактирования был выбран ген *FgOs1*, кодирующий осмосенсорную гистидинкиназу, нокаут которого приводит к резистентности к фенилпирролу и дикарбоксимиду. Для этого компоненты системы были интегрированы в геном в составе единой кассеты. При этом транскрипция sgRNA регулировалась *tef1* промотером и *gpdA* терминатором, отделённых от неё последовательностями рибозимов. Транскрипция оптимизированного гена *Cas9* регулировалась промотером гена *gpdA* и терминатором TRI4 [132].

Другой опасный патоген базидиомицетный гриб *Ustilago maidis*, вызывающий пузырчатую головню у кукурузы и теосинте, также был подвергнут геномному редактированию. В целях проверки работоспособности системы CRISPR/Cas были нокаутированы гены *bE1* и *bW2*. Компоненты системы транзистентно экспрессировались в грибной

клетке после трансформации плазмиды, при этом транскрипция sgRNA регулировалась промотором *U6*, а ген нуклеазы Cas9 промотором *tefl*. При этом не использовалась донорная ДНК, а эффективность редактирования составила 70–100%.

A. chrysogenum C10 используется в промышленном производстве цефалоспоринов С. Однако до сих пор нет полного понимания регуляции биосинтеза цефалоспоринов, что связано с техническими сложностями при генетических манипуляциях с промышленным штаммом. В недавней работе Чена с соавт [136] была сконструирована оригинальная система CRISPR-Cas9 на основе химерного промотора *U6* / тРНК. Эффективность использования такой системы достигала 90%. В работе использовались донорные репарационные ДНК. Система была опробована при удалении больших (до 31,5 т.п.о.) фрагментов ДНК, которые были задействованы в биосинтезе желтого соединения- сорбициллиноида, что позволяло вести селекцию мутантных штаммов по цвету культуральной жидкости. Интересно, что в нокаутных штаммах повысилась продукция цефалоспоринов.

V. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Как следует из обзора, система CRISPR / Cas успешно адаптирована и широко применяется при редактировании геномов многих мицелиальных грибов. За прошедшие пять лет, начиная с первого случая редактирования генома у гриба *Trichoderma reesei*, были изменены десятки различных геномов грибов, имеющих широкое применение в промышленной биотехнологии и сельском хозяйстве как источники ферментов, ферментных комплексов, вторичных метаболитов и других полезных продуктов.

Одной из основных проблем, возникающих при работе с мицелиальными грибами, является отсутствие у них известных промоторов РНК-полимеразы III. Однако, данную проблему можно решить, используя промотор РНК-полимеразы II и рибозимы, или же используя промотор 5S рРНК. Также следует отметить, что при работе с мицелиальными грибами вопрос о возможных *off-target* эффектах стоит не столь остро, поскольку грибные штаммы используют для получения определённых продуктов и, если их хозяйственные свойства не снижаются, то *off-target* эффектами геномного редактирования вполне можно пренебречь.

На сегодняшний день система CRISPR / Cas является передовой технологией для редактирования геномов, являясь наиболее универсальным инструментом для улучшения физиологических и биохими-

ческих свойств микро- и макроорганизмов. Система CRISPR / Cas быстро развивается, однако все еще остаются до конца нерешенными вопросы, связанные с эффективностью метода, способом доставки системы в клетку, *off-target* эффектами, важны и этические проблемы применения новой технологии. В ближайшие годы широкое использование CRISPR / Cas в области геномики и клеточной биологии значительно расширит имеющиеся знания, приобретенные человечеством посредством применения ДНК-технологий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Punt, P.J., van Biezen, N., Conesa, A., Albers, A., Mangnus, J., van den Hondel, C. (2002) Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production, *Trends in Biotechnology*, **20**, 5, 200–206.
2. Ward, O.P. (2012) Production of recombinant proteins by filamentous fungi, *Biotechnology Advances*, **30**, 1119–1139. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.09.012>
3. Lubertozzi, D., Keasling, J.D. (2008) Developing *Aspergillus* as a host for heterologous expression, *Biotechnology Advances*, **27**, 53–57. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.09.001>
4. Meyer, V. (2008) Genetic engineering of filamentous fungi- progress, obstacles, expression, *Biotechnology Advances*, **26**, 177–185. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.12.001>
5. de Vries, R. (2003) Regulation of *Aspergillus* genes encoding plant cell wall degrading enzymes: relevance for industrial production, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **61**, 10–20. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1171-9>
6. Schuster, A., Schmoll, M. (2010) Biology and biotechnology of *Trichoderma*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **87**, 787–799.
7. Kumar, R., Singh, S., Singh, O.V. (2008) Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **35**, 377–391.
8. Sinitsyn, A.P., Rozhkova, A.M. (2015) *Penicillium canescens* host as the platform for development of a new recombinant strains producers of carbohydrases, in *Microbiology Monographs, «Microorganisms in Biorefineries»* [Kamm B., ed.]. USA: Springer, 1–19.
9. Синицын А.П., Синицына О.А., Рожкова А.М. (2020) Получение промышленно важных ферментов на основе экспрессионной системы гриба *Penicillium verruculosum*, *Биотехнология*, в печати.
10. Harris, D.M., Westerlaken, I., Schipper, D., van der Krogt, Z.A., Gombert, A.K., Sutherland, J. (2009) Engineering of *Penicillium chrysogenum* for fermentative production of a novel carbamoylated cephem antibiotic precursor. *Metabolic Engineering*, **11**, 125–137.
11. Ozcengiz, G., Demain, A.L. (2013) Recent advances in the biosynthesis of penicillins, cephalosporins and clavams and its regulation, *Biotechnology Advances*, **31**, 287–311.
12. Corrêa, R.C.G., Rhoden, S.A., Mota, T.R., Azevedo, J.L., Pamphile, J.A., Marques de Souza, C.G., Teixeira de Moraes Polizeli, M.L., Adelar Bracht, A., Peralta, R.M. (2014) *Journal of Industrial Microbiology*

- and *Biotechnology*, **41**, 1467–1478. <https://doi.org/10.1007/s10295-014-1496-2>
13. Toghueo, R.M.K., Boyom, F.F. (2020) Endophytic *Penicillium* species and their agricultural, biotechnological and pharmaceutical application, *3 Biotech*, **10**, 3, 1–35. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-2081-1>
 14. Dashtban, M., Schraft H., Qin, W. (2009) Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; opportunities and perspectives, *International Journal of Biological Sciences*, **5**, 6, 578–595. <https://doi.org/10.7150/ijbs.5.578b>
 15. Raveendran, S., Parameswaran, B., Ummalya, S.B., Abraham, A., Mathew, A.K., Madhavan, A., Rebello, Sh., Pandey, A. (2018) Applications of Microbial Enzymes in Food Industry, *Food Technology and Biotechnology*, **56**, 16–30. <https://doi.org/10.17113/ftb.56.01.18.5491>
 16. MacKenzie, D.A., Jeenes D.J., Archer D.B. (2004) Filamentous fungi as expression systems for Heterologous Proteins, *Genetics and Biotechnology* (2nd Edition), Springer-Verlag Berlin-Heidelberg, 289–315.
 17. Kluge, J., Terfehr D., Kuck U. (2018) Inducible promoters and functional genomic approaches for genetic engineering of filamentous fungi, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **102**, 6357–6372. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9115-1>
 18. Penttilä M. (1998) Heterologous protein production in *Trichoderma*. In: Kubicek CP, Harman GE eds. *Trichoderma and Gliocladium: Enzymes, Biological Control and Commercial Applications*. London: Taylor and Francis Ltd. p. 365–381.
 19. Siedenberg, D., Mestric, S., Ganzlin, M., Schmidt, M., Punt, P.J., van den Hondel, C., Rinas, U. (1999) GlaA promoter controlled production of a mutant green fluorescent protein (S65T) by recombinant *Aspergillus niger* during growth on defined medium in batch and fed-batch cultures. *Biotechnology Progress*, **15**, 43–50. <https://doi.org/10.1021/bp980105u>
 20. Bulakhov, A.G., Volkov, P.V., Rozhkova A.M., Gusakov A.V., Nema-shkalov.V.A., Satrutdinov, A.D., Sinitsyn, A.P. (2017) Using an inducible promoter of a gene encoding *Penicillium verruculosum* glucosylase for production of enzyme preparations with enhanced cellulase performance, *PLoS One*, **12**, e0170404. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170404>
 21. Toews, M.W., Warmbold, J., Konzack, S., Rischitor, P., Veith, D., Vienken, K. (2004). Establishment of mRFP1 as a fluorescent marker in *Aspergillus nidulans* and construction of expression vectors for high-throughput protein tagging using recombination in vitro (GATEWAY), *Current Genetics*, **45**, 383–389.
 22. Dotsenko, G.S., Gusakov, A.V., Rozhkova, A.M., Korotkova, O.G., Sinitsyn, A.P., (2015) Heterologous beta-glucosidase in a fungal cellulase system: comparison of different methods for development of multienzyme cocktails, *Process Biochemistry*, **50**, 1258–1263. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.05.008>
 23. Landowski, C.P., Huuskonen, A., Wahl, R., Westerholm-Parvinen, A., Kanerva, A., Hänninen, A.-L., Salovuori, N., Penttilä, M., Natunen, J., Ostermeier, C., Helk, B., Saarinen, J., Saloheimo, M. (2015) Enabling Cost Biopharmaceuticals: A Systematic Approach to Delete Proteases from a Well-Known Protein Production Host *Trichoderma reesei*, *PLoS One*, **10**, 8, e0134723
 24. Gallo, A., Bruno, K.S., Solfrizzo, M., Perrone, G., Mule, G., Visconti, A., Baker, S. (2012) New insight into the ochratoxin A biosynthetic pathway through deletion of a nonribosomal peptide synthetase gene in *Aspergillus carbonarius*, *Applied Environmental Microbiology*, **78**, 23, 8208–8218. <https://doi.org/10.1128/AEM.02508-12>

25. Selina Oh Siew Ling, S., Storms, R., Zheng, Yu., Mohd Rodzi, M.R., Mahadi, M., Illias, R.M., Abdul Murad, A.M., Abu Bakar, F.D. (2013) Development of a pyrG mutant of *Aspergillus oryzae* strain S1 as a host for the production of heterologous proteins, *Scientific World Journal*, ID 634317. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/634317>
26. Tanaka, M., Ichinose, S., Shintani, T., Gomi, K. (2018). Nuclear export-dependent degradation of the carbon catabolite repressor CreA is regulated by a region located near the C-terminus in *Aspergillus oryzae*, *Molecular Microbiology*, **110**, 176–190. <https://doi.org/10.1111/mmi.14072>
27. Todd, R., Lockington, R., Kelly, J. (2000) The *Aspergillus nidulans* creC gene involved in carbon catabolite repression encodes a WD40 repeat protein, *Molecular Genetics and Genomics*, **263**, 561–570. <https://doi.org/10.1007/s004380051202>
28. Tamayo-Ramos, J.A., Orejas, M. (2014) Enhanced glycosyl hydrolase production in *Aspergillus nidulans* using transcription factor engineering approaches. *Biotechnology for Biofuels*, **7**, 103. <https://doi.org/10.1186/1754-6834-7-103>
29. Tani, S., Katsuyama, Y., Hayashi, T., Suzuki, H., Kato, M., Gomi, K., et al. (2001). Characterization of the *amyR* gene encoding a transcriptional activator for the amylase genes in *Aspergillus nidulans*, *Current Genetics*, **39**, 10–15. <https://doi.org/10.1007/s002940000175>
30. Liu, L., Liu, J., Qiu, R. X., Zhu, X. G., Dong, Z. Y., Tang, G. M. (2003) Improving heterologous gene expression in *Aspergillus niger* by introducing multiple copies of protein-binding sequence containing CCAAT to the promoter. *Letters in Applied Microbiology*, **36**, 358–361.
31. Zou, G., Shi, S., Jiang, Y., van den Brink, J., de Vries, R. P., Chen, L., et al. (2012) Construction of a cellulase hyper-expression system in *Trichoderma reesei* by promoter and enzyme engineering. *Microbial Cell Factories*, **11**, 21
32. Sun, X., Zhang, X., Huang, H., Wang, Y., Tu, T., Bai, Y., et al. (2020) Engineering the *cbh1* promoter of *Trichoderma reesei* for enhanced protein production by replacing the binding sites of a transcription repressor ACE1 to those of the activators, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **68**, 1337–1346. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b05452>
33. Weld, R.J., Plummer, K.M., Carpenter, M.A., Ridgway, H.J. (2006) Approaches to functional genomics in filamentous fungi, *Cell Research*, **16**, 31–44. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7310006>
34. Krappmann, S., Sasse, C., Braus, G.H. (2006) Gene targeting in *Aspergillus fumigatus* by homologous recombination is facilitated in a non-homologous end-joining-deficient genetic background, *Eukaryotic Cell*, **5**, 212–215.
35. Meyer, V., Arentshorst, M., El-Ghezal, A., Drews, A.C., Kooistra, R., van den Hondel C.A., (2007) Highly efficient gene targeting in the *Aspergillus niger kusA* mutant, *Journal of Biotechnology*, **128**, 770–775.
36. Ninomiya, Y., Suzuki, K., Ishii, C., Inoue, H. (2004) Highly efficient gene replacements in *Neurospora* strains deficient for nonhomologous end-joining, *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**, 12248–12253.
37. Liu, G., Zhang, J., Bao, J. (2016) Cost evaluation of cellulase enzyme for industrial-scale cellulosic ethanol production based on rigorous Aspen Plus modeling, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, **39**, 133–140.
38. Hu, Y., Zhu, B. (2016) Study on genetic engineering of *Acremonium chrysogenum*, the cephalosporin C producer, *Synthetic and Systems Biotechnology*, **1**, 3143–149. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2016.09.002>

39. Peterson, R., Nevalainen, H. (2012) *Trichoderma reesei* RUT-C30—thirty years of strain improvement, *Microbiology*, **158**, 58–68. <https://doi.org/10.1099/mic.0.054031-0>
40. Wu, I., Arnold, F. (2013) Engineered thermostable fungal Cel6A and Cel7A cellobiohydrolases hydrolase cellulase efficiently at elevated temperatures, *Biotechnology and Bioengineering*, **110**, 1874–1883. <https://doi.org/10.1002/bit.24864>
41. Bornscheuer, U.T., Hauer, B., Jaeger, K.E., Schwaneberg, U. (2019) Directed evolution empowered redesign of natural proteins for the sustainable production of chemicals and pharmaceuticals. *Angewandte Chemie International Edition*, **58**, 36–40.
42. Markel, U., Essani, K.D., Besirlioglu, V., Schiels, J., Streit, W.R., Schwaneberg, U. (2020) Advances in ultrahigh-throughput screening for directed enzyme evolution, *Chemistry Society Review*, **49**, 233–262.
43. Zhang, F., Li, J.-X., Champreda, V., Liu, C.-G., Bai, F.-W., Zhao, X.-Q. (2020) Global Reprogramming of Gene Transcription in *Trichoderma reesei* by Overexpressing an Artificial Transcription Factor for Improved Cellulase Production and Identification of Ypr1 as an Associated Regulator, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, **8**, 649. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00649>
44. Künkel, W., Berger, D., Risch, S., Wittmann-Bresinsky, B. (1992) Genetic instability of industrial strains of *Penicillium chrysogenum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **36**, 4, 499–502.
45. Contreras, F., Thiele, M.J., Pramanik, S., Rozhkova, A., Dotsenko, A.S., Zorov, I.N., Sinitsyn, A.P. (2020), KnowVolution of GH5 Cellulase from *Penicillium verrucosum* to Improve Thermal Stability for Biomass Degradation, *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, **12**, 08, 2020, <https://dx.doi.org/10.1021/acssuschemeng.0c02465>
46. Contreras, F., Pramanik, S., Rozhkova, A.M., Zorov I.N., Korotkova, O.G., Sinitsyn A.P., Schwaneberg U., Davari M.D. (2020) Engineering Robust Cellulases for Tailored Lignocellulosic Degradation Cocktails, *International Journal of Molecular Sciences*, **21**, 1589. <https://doi.org/10.3390/ijms21051589>
47. Larue, K., Melgar, M., Martin, V.J. (2016) Directed evolution of a fungal beta-glucosidase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology for Biofuels*, **9**, 52.
48. Hardiman, E., Gibbs, M., Reeves, R., Bergquist, P. (2010) Directed evolution of a thermophilic beta-glucosidase for cellulosic bioethanol production, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **161**, 301–312.
49. Sontheimer, E.J., Barrangou, R. (2015) Origins of the CRISPR Genome-Editing Revolution, *Human Gene Therapy*, **26**, 7, 413–424. <https://doi.org/10.1089/hum.2015.091>
50. Chen, L., Tang, L., Xiang, H., Jin, L., Li, Q., Dong, Y., Wang, W., Zhang, G. (2014) Advances in genome editing technology and its promising application in evolutionary and ecological studies, *Gigasciences*, **3**, 24. <https://doi.org/10.1186/2047-217X-3-24>
51. Liu, W., An, Ch., Sgu, X., Meng, X., Yao, Y., Zhang, J., Xiang, H., Yang, S., Gao, X., Gao, S.-Sh. (2020) A Dual-Plasmid CRISPR/Cas System for Mycotoxin Elimination in Polycaryotic Industrial Fungi, *ACS Publications*, **9**, 8, 2087–2095. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.0c00178>
52. Tyagi, S., Kumar, R., Das, A., Won, S.-Y., Shukla, P. (2020) CRISPR-Cas9 system: A genome-editing tool with endless possibilities, *Journal of Biotechnology*, **319**, 36–53. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.05.008>

53. Mali, P., Esvelt, K.M., Church, G.M. (2013) Cas9 as a versatile tool for engineering biology, *Nature Methods*, **10**, 957–963. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2694>
54. Basset, A.R., Liu, J.L. (2014) CRISPR/Cas9 and genome editing in *Drosophila*, *Journal of Genetics and Genomics*, **41**, 1, 7–19. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.20013.12.004>
55. Blackburn, P.R., Campbell, J.M., Clark, K.J., Ekker, S.C. (2013) The CRISPR system-keeping zebrafish gene targeting fresh, *Zebrafish*, **10**, 1, 116–118. <https://doi.org/10.1089/zeb.2013.9999>
56. Ebina, H., Misawa, N., Kanemura, Y., Koyanagi, Y. (2013) Harnessing the CRISPR/Cas9 system to disrupt latent HIV-1 provirus, *Science Reports*, **3**, 2510. <https://doi.org/10.1038/srep02510>
57. Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M., Nakata A. (1987) Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase conversation in *Escherichia coli*, and identification of the gene product, *Journal of Bacteriology*, **169**, 5429–5433.
58. Mojico, F. J., Diez-Villasenor, C., Soria, E., Juez, G. (2000) Biological significans of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria, *Molecular Microbiology*, **36**, 244–246.
59. Jansen, R., van Embden, J.D.A., Gastra, W., Schlous, L.M. (2002) Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes, *Molecular Microbiology*, **43**, 1565–1575.
60. Barrangou, R., Fremax, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D.A., Horvath, P. (2007) CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes, *Science*, **315**, 1709–1712.
61. Nødvig, C.S., Nielsen, J.B., Kogle, M.E., Mortensen, U.H. (2015) A CRISPR-Cas9 system for genetic engineering of filamentous fungi, *PLoS One*, **10**, 7, e0133085. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133085>
62. DiCarlo, J.E., Norville, J.E., Mali, P., Rios, X., Aach, J., Church, G.M. (2013) Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems, *Nuclear Acids Research*, **41**, 7, 4336–4343. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt135>
63. Horwitz, A.A., Walter, J.M., Schubert, M.G., Kung, S.H. (2015) Efficient multiplexed integration of synergistic alleles and metabolic pathways in yeasts via CRISPR-Cas, *Cell systems*, **1**, 1, 88–96. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2015.02.001>
64. Curran K.A., Crook, N., Karim, A., Gupta, A., Wagman, A., Alpe, H. (2014) Design of synthetic yeast promoters via tuning of nucleosome architecture, *Nature Communications*, **5**, 4002. <https://doi.org/10.1038/ncomms5002>
65. Doudna, J.A., Charpentier, E. (2014) The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9, *Science*, **346**, 6213, 1077–1087. <https://doi.org/10.1126/science.1258096>
66. Makarova, K.S., Wolf, Y.I., Koonin, E.V. (2013) The basic building blocks and evolution of CRISPR-CAS systems, *Biochemical Society Transaction*, **41**, 1392–1400. <https://doi.org/10.1042/BST20130038>
67. Wang, S., Chen, H., Tang, X., Zhang, H., Chen, W., Chen, Y.Q. (2017) Molecular tools for gene manipulation in filamentous fungi, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **101**, 8063–8075. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8486-z>
68. Ran, F.A., Hsu, P.D., Lin, C.Y., Gootenberg, J.S. Konermann, S., Trevino, A.E., Scott, D.A., Inoue, A., Matoba, S., Zhang, Y., Zhang, F. (2013) Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity, *Cell*, **154**, 6, 1380–1389. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.021>

69. Hsu P.D., Lander, E.S., Zhang, F. (2014) Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering, *Cell*, **157**, 6, 1262–1278. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.010>
70. Makarova, K.S., Haft, D/H., Barangou, R., Brouns, S.J., Charpentier, E., Horvath, P., Moineau, S., Mojica, f.J., Wolf, Y.I., Yakunin A.F., Oost, J.V.D., Koonin, E.V. (2011) Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems, *Nature Review of Microbiology*, **9**, 467–477.
71. Haft, D.H., Selengut, J., Mongodin, E.F., Nelson, K.E. (2005) A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR-Cas subtypes exist in prokaryotic genomes, *PLoS Computational Biology*, **1**, e60.
72. Chylinsky, K., Le, R.A., Charpentier, E. (2013) The tracrRNA and Cas9 families of type II CRISPR-Cas immunity systems, *RNA Biology*, **10**, 726–737.
73. Jinek, M., Chulinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J., Charpentier, E. A. (2012) Programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease immunity, *Science*, **337**, 816–821.
74. Kuscu, C., Arslan, S., Singh, R., Thorpe, J., Adli, M. (2014) Genome wide analysis reveals characteristics of off-target sites bound by Cas9 endonuclease, *Nature Biotechnology*, **32**, 677–683.
75. Cong, L., Ran, F.A., Cox, D., Lin, S., Barreto, R., Habib, N. (2013) Multiplex genome engineering using CRISPR-Cas systems, *Science*, **339**, 197–217.
76. Mali, P., Yang, L., Esvelt, K.M., Aach, J., Guell, M., Dicarlo, J.E. (2013) RNA-guided human genome engineering via Cas9, *Science*, **339**, 823–826.
77. Jiang F., Zhou K., Ma L., Gressel S., Doudna J.A. (2015) A Cas9-guide RNA complex preorganized for target DNA recognition, *Science*, **348**, 1477–1481.
78. Huai, C., Li, G., Yao, R., Zhang, Y., Cao, M., Kong, L., Jia, C., Yuan, H., Chen, H., Lu, D., Huang, Q. (2017) Structural insights into DNA cleavage activation of CRISPR-Cas9 system, *Nature Communication*, **8**, 1375.
79. Stenberg, S. H., Redding, S., Jinek, M., Greene, E. C., Doudna, J. A. (2014) DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9, *Nature*, **507**, 62–67.
80. Rutkauskas, M., Sinkunas, T., Songailiene, I., Tikhomirova, M. S., Siksny, V., Seidel R. (2015) Directional R-loop formation by the CRISPR-Cas surveillance complex Cascade provides efficient off-target site rejection, *Cell Reports*, **10**, 1534–1543.
81. Palermo, G., Miao, Y., Walker, R.C., Jinek, M., McCammon, J.A. (2016) Striking plasticity of CRISPR-Cas9 and key role of non-target DNA, as revealed by molecular simulations, *ACS Central Science*, **2**, 756–763.
82. Sternberg, S.H., LaFrance, B., Kaplan, M., Doudna, J.A. (2015) Conformational control of DNA target cleavage by CRISPR-Cas, *Nature*, **527**, 110–113.
83. Nødvig, C.S., Hoof, J.B., Kogle, M.E., Jarczynska, Z.D., Lehmebeck, J., Klitgaard, D.K., Mortensen, U.H. (2018) Efficient oligo nucleotide mediated CRISPR-Cas9 gene editing in *Aspergilli*. *Fungal Genetics and Biology*, **115**, 78–89. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2018.01.004>
84. Wang, Q., Cobine, P.A., Coleman, J.J. (2018) Efficient genome editing in *Fusarium oxysporum* based on CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes, *Fungal Genetics and Biology*, **117**, 21–29. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2018.05.003>
85. Chen, J., Lai, Y., Wang, L., Zhai, S., Zou, G., Zhou, Z., Cui, C., Wang, S. (2017) CRISPR/Cas9-mediated efficient genome editing via blastospore-based transformation in entomopathogenic fungus *Beauveria bas-*

- siana*. *Scientific Reports*, **8**, 45763. <https://doi.org/10.1038/srep45763>
86. Chen, B.X., Wei, T., Ye, Z.W., Yun, F., Kang, L.Z., Tang, H.B., Guo, L.Q., Lin, J.F. (2018) Efficient CRISPR-Cas9 gene disruption system in edible medicinal mushroom *Cordyceps militaris*, *Frontier Microbiology*, **9**, 1157. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01157>
87. Кислицин В.Ю., Чулкин А.М., Синельников И.Г., Синецын А.П., Рожкова А.М. (2020) Экспрессия нуклеазы CAS9 комплекса CRISPR/CAS системы редактирования генома в мицелиальном грибе *Penicillium verruculosum*, *Вестник Московского Университета. Серия 2*, **61**, 4, 47–54.
88. Matsu-Ura, T., Baek, M., Kwon, J., Hong, C. (2015) Efficient gene editing in *Neurospora crassa* with CRISPR technology, *Fungal Biology and Biotechnology*, **2**, 4, 1–7 <https://doi.org/10.1186/s40694-015-0015-1>
89. Sarkari, P., Marx, H., Blumhoff, M.L., Mattanovich, D., Sauer, M., Steiger, M.G. (2017) An efficient tool for metabolic pathway construction and gene integration for *Aspergillus niger*, *Bioresour Technology*, **245**, 1327–1333. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.05.004>
90. Pohl, C., Kiel, J.A.K.W., Driessen, A.J.M., Bovenberg, R.A.L., Nygard, Y. (2016) CRISPR/Cas9 based genome editing of *Penicillium chrysogenum*, *ACS Synthetic Biology*, **5**, 754–764. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.6b00082>
91. Zhang, C, Meng, X, Wei, X, Lu, L (2016) Highly efficient CRISPR mutagenesis by microhomology-mediated end joining in *Aspergillus fumigatus*, *Fungal Genetics and Biology*, **86**, 47–57. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.12.007>
92. Katayama, T., Tanaka, Y., Okabe, T., Nakamura, H., Fujii, W., Kitamoto, K. (2016) Development of a genome editing technique using the CRISPR/Cas9 system in the industrial filamentous fungus *Aspergillus oryzae*, *Biotechnology Letters*, **38**, 4, 637–642. <https://doi.org/10.1007/s10529-015-2015-x>
93. Schuster, M., Schweizer, G., Kahmann, R. (2018) Comparative analyses of secreted proteins in plant pathogenic smut fungi and related basidiomycetes, *Fungal Genetics and Biology*, **112**, 21–30. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2016.12.003>
94. Schuster, M., Schweizer, G., Reissmann, S., Kahmann, R. (2016) Genome editing in *Ustilago maydis* using the CRISPR-Cas system. *Fungal Genetics and Biology*, **89**, 3–9. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.09.001>
95. Deng, H, Gao, R, Liao, X, Cai, Y (2017) Characterization of a major facilitator superfamily transporter in *Shiraia bambusicola*, *Research of Microbiology*, **168**, 664–672. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2017.05.002>
96. Deng, H, Gao, R, Liao, X, Cai, Y (2017) Genome editing in *Shiraia bambusicola* using CRISPR-Cas9 system, *Journal of Biotechnology*, **259**, 228–234. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.06.1204>
97. Lee, C.M., Cradick, T.J., Bao, G. (2016) The *Neisseria meningitidis* CRISPR-Cas System enables specific genome editing in mammalian cells, *Molecular Therapy*, **24**, 645–654.
98. Zetsche, B., Gootenberg, J.S., Abudayyeh, O.O., Slaymaker, I.M., Makarova, K.S., Essletzbichler, P., Volz, S.E., Joung, J., van der Oost, J., Regev, A., Koonin, E.V., Zhang, F. (2015) Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of class 3 CRISPR-Cas system, *Cell*, **163**, 759–771.
99. Swiat, M.A., Dashko, S., den Ridder, M., Wijsman, M., van der Oost, J., Daran, J., Daran-Lapujade, P. (2017) FnCpf1: a novel and efficient genome editing tool for *Saccharomyces cerevisiae*, *Nucleic Acid Research*, **45**, 21, 12585–12598.

100. Liu, L., Li, X., Ma, J.Z., Li, Y., Wang, L., Wang, J., Zhang, X., Wang, Y. (2017) The molecular architecture for RNA-Guided RNA cleavage by Cas13a, *Cell*, **170**, 714–726.
101. Gao, Y., Zhao, Y. (2014) Self-processing of ribozyme-flanked RNAs into guide RNAs in vitro and in vivo for CRISPR-mediated genome editing, *Journal of Integrated Plant Biology*, **56**, 343–349. <https://doi.org/10.1111/jipb.12152>
102. Liang, Y., Han, Y., Wang C., Jiang, C., Xu, J.R. (2018) Targeted deletion of the USTA and UvSLT2 genes efficiently in *Ustilaginoidea virens* with the CRISPR-Cas9 system, *Frontier Plant Science*, **9**, 699. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00699>
103. Zheng, X., Zheng, P., Zhang, K., Cairns, T. C., Meyer, V., Sun, J., Ma, Y. (2018) 5S rRNA promoter for guide RNA expression enabled highly efficient CRISPR/Cas9 genome editing in *Aspergillus niger*, *ACS Synthetic Biology*, **8**, 7, 1568–1574.
104. Nissim, L., Perli, S.D., Fridkin, A., Perez-Pinera, P., Lu, T.K. (2014) Multiplexed and programmable regulation of gene networks with an integrated RNA and CRISPR/Cas toolkit in human cells, *Molecular Cell*, **54**, 698–710. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.04.022>
105. Wang, J., Li, X., Zhao, Y., Li, J., Zhou, Q., Liu, Z. (2015) Generation of cell-type-specific gene mutations by expressing the sgRNA of the CRISPR system from the RNA polymerase II promoters, *Protein Cell*, **6**, 689–692. <https://doi.org/10.1007/s13238-015-0169-x>
106. Xue, W., Chen, S., Yin, H., Tammela, T., Papagiannakopoulos, T., Joshi, N.S., Cai, W., Yang, G., Bronson, R., Crowley, D.G., Zhang, F., Anderson, D.G., Sharp, P.A., Jacks, T. (2014) CRISPR-mediated direct mutation of cancer genes in the mouse liver, *Nature*, **514**, 380–384. <https://doi.org/10.1038/nature13589>
107. Shi, T-Q., Liu, G-N., Ji, R-Yu., Shi, K., Song, P., Ren, L-J., Huang, H., Ji, X-J. (2017) CRISPR/Cas9-based genome editing of filamentous fungi: the state of the art, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **101**, 7435–7443.
108. Huang, L., Dong, H., Zheng, J., Wang, B., Pan, L. (2019) Highly efficient single base editing in *Aspergillus niger* with CRISPR/Cas9 cytidine deaminase fusion. *Microbiological Research*, **223**, 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.03.007>.
109. Liu, R., Chen, L., Jiang, Y., Zhou, Z., Zou, G. (2015) Efficient genome editing in filamentous fungus *Trichoderma reesei* using the CRISPR/Cas9 system, *Cell Discovery*, **1**, 15007. <https://doi.org/10.1038/celldisc.2015.7>
110. Nielsen, M.L., Isbrandt, T., Rasmussen, K.B., Thrane, U., Hoof, J.B., Larsen, T.O. (2017) Genes linked to production of secondary metabolites in *Talaromyces atrovirens* revealed using CRISPR-Cas9, *PLoS One*, **12**, 1, e0169712. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169712>
111. Salazar-Cerezo, S., Kun R.S., de Vries, R.P., Garrigues, S. (2020) CRISPR/Cas9 technology enables the development of the filamentous ascomycete fungus *Penicillium subrubescens* as a new industrial enzyme producer, *Enzyme and Microbial Technology*, **133**, 109463. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2019.109463>
112. Yamato, T., Handa, A., Arazoe, T., Kuroki, M., Nozaka, A., Kamakura, T., Ohsato, S., Arie, T., Kuwata, S. (2019) Single crossover-mediated targeted nucleotide substitution and knock-in strategies with CRISPR/Cas9 system in the rice blast fungus, *Science Reports*, **9**, 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-43913-0>
113. Liu, Q., Gao, R., G., Li, J., Lin, L., Zhao, J., Sun, W., Tian, Ch. (2017) Development of a genome-

- editing CRISPR/Cas9 system in thermophilic fungal *Myceliophthora* species and its application to hypercellulase production strain engineering, *Biotechnology for Biofuels*, **10**, 1, 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13068-016-0693-9>
114. Fuller, K.K., Chen, S., Loros, J.J., Dunlap, J.C. (2015) Development of the CRISPR/Cas9 system for targeted gene disruption in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryotic Cell*, **14**, 11, 1073–1080. <https://doi.org/10.1128/EC.00107-15>
115. Fang, Y., Tyler, B.M., (2016) Efficient disruption and replacement of an effector gene in the oomycete *Phytophthora sojae* using CRISPR/Cas9, *Molecular Plant Pathology*, **17**, 127–139.
116. Kuivanen J., Wang Y.-M. J. Richard P. (2016) Engineering *Aspergillus niger* for galactaric acid production: elimination of galactaric acid catabolism by using RNA sequencing and CRISPR/Cas9, *Microbial Cell Factory*, **15**, 210.
117. Weyda, I., Yang, L., Vang, J., Ahring, B.K., Lubeck, M., Lubeck, P.S. (2017) A comparison of Agrobacterium-mediated transformation and protoplast-mediated transformation with CRISPR-Cas9 and bipartite gene targeting substrates, as effective gene targeting tools for *Aspergillus carbonarius*. *Journal of Microbiological Methods*, **135**, 26–34.
118. Wenderoth, M., Pinecker, C., Voß, B., Fischer, R. (2017) Establishment of CRISPR/Cas9 in *Alternaria alternata*, *Fungal Genetic Biology*, **101**, 55–60.
119. Weber, J., Valiante, V., Nødvig, C.S., Mattern, D.J., Slotkowski, R.A., Mortensen, U.H. (2017) Functional reconstitution of a fungal natural product gene cluster by advanced genome editing. *ACS Synthetic Biology*, **6**, 1, 62–68. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.6b00203>
120. Wu., C., Chen, Y., Qiu., Y., Niu., X., Zhu., N., Chen., J., Yao., H., Wang., W., Ma., Y. (2020) A simple approach to mediate genome editing in the filamentous fungus *Trichoderma reesei* by CRISPR/Cas9-coupled in vivo gRNA transcription, *Biotechnology Letters*, **42**, 1203–1210. <https://doi.org/10.1007/s10529-020-02887-0>
121. Zhang, L., Zhao, X., Zhang, G., Zhang, J., Wang, X., Zhang, S., Wang, W., Wei, D. (2016) Light-inducible genetic engineering and control of non-homologous end-joining in industrial eukaryotic microorganisms: LML 3.0 and OFN 1.0, *Science Reports*, **6**, 20761.
122. Kocak, D.D., Josephs, E.A., Bhandarkar, V., Adkar, Sh., Kwon, J., Gersbach, Ch. (2019) Increasing the specificity of CRISPR systems with engineered RNA secondary structures, *Nature Biotechnology*, **37**, 657–666. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0095-1>
123. Cui, Y., Xu, J., Cheng, M., Liao, X., Peng, S. (2018) Review of CRISPR/Cas9 sgRNA Design Tools, *Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences*, **10**, 2, 455–465.
124. Kuivanen, J., Arvas, M., Richard, P. (2017) Clustered genes encoding 2-keto-l-gulonate reductase and l-idonate 5-dehydrogenase in the novel fungal d-glucuronic acid pathway. *Frontiers of Microbiology*, **8**, 225. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00225>
125. Li, J., Zhang, Y., Zhang, Y., Yu, P.L., Pan, H., Rollins, J.A. (2018) Introduction of large sequence inserts by CRISPR-Cas9 to create pathogenicity mutants in the multinucleate filamentous pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*, *MBio*, **9**, 3, e00567–e00518. <https://doi.org/10.1128/mBio.00567-18>
126. Miao, J, Li, X, Lin, D, Liu, X, Tyler, B.M. (2018) Oxysterol-binding protein-related protein 2 is not essential for *Phytophthora sojae* based on CRISPR/Cas9 deletions. *Environmental Microbiology Re-*

- ports, **10**, 293–298. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12638>
127. Rantasalo, A., Vitikainen, M., Paasikallio, T., Jäntti, J., Landowski, C.P., Mojzita, D. (2019) Novel genetic tools that enable highly pure protein production in *Trichoderma reesei*. *Scientific Reports*, **9**, 5032. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41573-8>
128. Kuivanen, J., Korja, V., Holmström, S., Richard, P. (2019) Development of microtiter plate scale CRISPR/Cas9 transformation method for *Aspergillus niger* based on *in vitro* assembled ribonucleoprotein complexes. *Fungal Biology and Biotechnology*, **6**, 3. <https://doi.org/10.1186/s40694-019-0066-9>
129. Dong, L., Lin, X., Yu, D., Huang, L., Wang, B., Pan, L. (2020) High-level expression of highly active and thermostable trehalase from *Myceliophthora thermophila* in *Aspergillus niger* by using the CRISPR/Cas9 tool and its application in ethanol fermentation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **47**, 133–144. <https://doi.org/10.1007/s10295-019-02252-9>
130. Manglekar, R.R., Geng, A. (2020) CRISPR-Cas9-mediated *seb1* disruption in *Talaromyces pinophilus* EMU for its enhanced cellulase production. *Enzyme and Microbial Technology*, **140**, 109646. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2020.109646>
131. Rojas-Sánchez, U., López-Calleja, A.C., Millán-Chiu, B.E., Fernández, F., Loske, M., Gómez-Lim, M.A. (2020) Enhancing the yield of human erythropoietin in *Aspergillus niger* by introns and CRISPR-Cas9. *Protein Expression and Purification*, **168**, 105570. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2020.105570>
132. Gardiner, D.M., Kazan, K. (2018) Selection is required for efficient Cas9-mediated genome editing in *Fusarium graminearum*. *Fungal Biology*, **122**, 131–137. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2017.11.006>
133. Liu, R., Chen, L., Jiang, Y., Zou, G., Zhou, Z. (2017) A novel transcription factor specifically regulates GH11 xylanase genes in *Trichoderma reesei*. *Biotechnology for Biofuels*, **10**, 194.
134. Katayama, T., Nakamura, H., Zhang, Y., Pascal, A., Fujii, W., Maruyama, J.I. (2019) Forced recycling of an AMA1-based genome-editing plasmid allows for efficient multiple gene deletion/integration in the industrial filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. *Applied Environmental Microbiology*, **85**, 3, e01896–e01818. <https://doi.org/10.1128/AEM.01896-18>
135. Song, R., Zhai, Q., Sun, L., Huang, E., Zhang, Y., Zhu, Y., Guo, Q., Tian, Y., Zhao, B., Lu, H. (2019) CRISPR/Cas9 genome editing technology in filamentous fungi: progress and perspective. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **103**, 6919–6932.
136. Chen, C., Liu, J., Dua, C., Pan, Y., Liu, G. (2020) Improvement of the CRISPR-Cas9 mediated gene disruption and large DNA fragment deletion based on a chimeric promoter in *Acremonium chrysogenum*. *Fungal Genetics and Biology*, **134**, 103279. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2019.103279>