

УДК 577.21

ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ОЦЕНКИ АКТИВНОСТИ МУТАНТНЫХ ВАРИАНТОВ Cas9 В ДРОЖЖАХ *Saccharomyces cerevisiae*

© 2022 г. Д. С. Спасская^а, *, А. И. Давлетшин^б, В. В. Тютяева^а,
К. А. Кулагин^б, Д. Г. Гарбуз^а, Д. С. Карпов^а

^аЦентр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

^бИнститут молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия
*e-mail: drspssk@gmail.com

Поступила в редакцию 16.05.2022 г.

После доработки 01.06.2022 г.

Принята к публикации 01.06.2022 г.

Ключевым компонентом революционной технологии редактирования генома с помощью CRISPR/Cas системы *Streptococcus pyogenes* служит мультидоменный белок SpCas9 (Cas9). Однако специфичность фермента Cas9 дикого типа недостаточно высока для редактирования больших геномов высших эукариот, что ограничивает реализацию потенциала геномного редактирования как в фундаментальной науке, так и в терапии генетических заболеваний. Основным способом получения более точных вариантов Cas9 служит мутагенез с последующей характеристикой мутантных белков в какой-либо тест-системе *in vitro* или *in vivo*. Описанные в литературе *in vitro* и некоторые *in vivo* тест-системы чаще всего трудозатратны и имеют ограничения по масштабированию, которое необходимо, в частности, для скрининга библиотек мутантных вариантов Cas9. С целью разработки простого метода для высокопроизводительного скрининга Cas9-мутантов *in vivo* мы охарактеризовали три тест-системы, использующие CRISPR/Cas9-опосредованную инактивацию репортерных генов *tsPurple*, *ADE2* и *URA3* в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* как в модельном объекте. В экспериментах измерили активности высокоточных форм evoCas9 и HiFiCas9 по отношению к белку дикого типа. Установлено, что наиболее валидным способом оценки активности Cas9 служит метод с инактивацией гена *ADE2*. В полученной тест-системе показана чувствительность высокоточных вариантов Cas9 к структуре хроматина. Предложенная тест-система может быть применима в разработке редакторов генома нового поколения.

Ключевые слова: Cas9, *URA3*, *ADE2*, редактирование генома, *Saccharomyces cerevisiae*

DOI: 10.31857/S0026898422060209

Система адаптивного иммунитета бактерий и архей CRISPR/Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein) десять лет назад получила новое применение в качестве удобного и простого в исполнении метода внесения мутаций в эукариотический геном [1]. Из всего разнообразия открытых к настоящему времени CRISPR-систем наиболее популярной и хорошо изученной остается система II типа, в которой белковый эффектор представлен одним мультифункциональным белком бактерии

Streptococcus pyogenes — SpCas9 (Cas9) ([2]. Целевая последовательность для Cas9 в геноме программируется исследователем с помощью короткого РНК-спейсера в составе направляющей РНК (гид-РНК) [3]. После распознавания целевого участка ДНК с помощью гид-РНК нуклеаза Cas9 вносит двухцепочечный разрыв в ДНК, который активирует клеточные механизмы репарации ДНК по пути соединения негомологичных концов (NHEJ), а при наличии донорного фрагмента — по пути гомологичной рекомбинации [4].

Благодаря удобному “программированию” белок Cas9 стал использоваться в клинических исследованиях в качестве инструмента редактирования генома при терапии генетических заболеваний человека [5]. Однако клиническое применение Cas9 сильно ограничено относительно низкой точностью распознавания, проявляющейся в способности разрезать геномную ДНК при неполном

Сокращения: CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) — короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами; Cas (CRISPR associated protein) — белок, ассоциированный с CRISPR; PAM (protospacer adjacent motif) — мотив, примыкающий к протоспейсеру; 5-FOA (5-Fluorooctotic acid) — 5-фтороротовая кислота; NHEJ (Non-Homologous End Joining) — путь репарации двухцепочечных разрывов ДНК по механизму соединения негомологичных концов.

совпадении со спейсером гид-РНК – вплоть до четырех и более неправильно спаренных оснований [6]. Именно этот механизм лежит в основе нецелевой активности Cas9, то есть способности вносить двухцепочечный разрез не только в нужный участок генома, но и в близкие по последовательности локусы, вызывая тем самым появление нежелательных мутаций [7]. Для повышения специфичности нуклеазы получено множество мутантных вариантов Cas9 – с использованием как случайного, так и рационального мутагенеза [8–14]. Однако замечено, что полученные варианты уступают в активности Cas9 дикого типа на ряде мишеней ДНК *in vivo* [12, 15], из чего следует вывод о необходимости дальнейшего совершенствования этого инструмента. При характеристике множества новых мутантных вариантов Cas9, полученных, например, методами белковой эволюции, возникает необходимость использования высокопроизводительного подхода. Оценка активности и специфичности вариантов Cas9 сводится к определению наличия мутаций в целевых и нецелевых последовательностях ДНК соответственно. Существует группа методов определения активности Cas9 *in vitro*, которые во многом повторяют существующие технологии детекции однонуклеотидных полиморфизмов: секвенирование, разные варианты полимеразной цепной реакции, анализ ампликонов методами построения кривых плавления гетеродуплексов, распознавания нуклеазами T7E1 и Surveyor и другие (подробно описаны в обзорах [16, 17]). Однако в протоколах всех этих методов предусмотрена очистка ДНК, причем из большого числа образцов. Еще более трудоемкие методы анализа нуклеазной активности Cas9 подразумевают очистку белка, синтез гид-РНК и сборку всех компонентов реакции в одной пробирке [18]. Однако следует учитывать, что *in vivo* в эукариотических клетках Cas9 имеет совершенно иной, чем в прокариотах и *in vitro*, профиль активности по отношению к целевым и нецелевым участкам, а также толерантности к неправильно спаренным основаниям между спейсером и ДНК-мишенью [19]. По-видимому, это связано с влиянием хроматина на активность Cas9 [20, 21]. По этой причине назрела необходимость в разработке простых и при этом высокопроизводительных методов для оценки активности и специфичности новых вариантов Cas9 в эукариотах. Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* обладают структурой хроматина, близкой к высшим эукариотам, при этом они быстро растут, их легко культивировать, причем без особых затрат на оборудование и материалы. На твердой питательной среде они формируют из отдельных клеток колонии, что упрощает анализ отредактированных генов. Кроме того, клетки дрожжей *S. cerevisiae* могут быть использованы для сборки плазмидных конструкций системы

CRISPR/Cas9 методом рекомбинационного клонирования – благодаря наличию высокоактивной системы гомологичной рекомбинации [22, 23].

В представленной работе методом рекомбинационного клонирования получены дрожжевые плазмиды, экспрессирующие высокоточные варианты HiFiCas9 (HiFi – High Fidelity, высокоточный) и evoCas9 (evo – от evolutioned, эволюционированный), а также два мутантных варианта evoCas9, и оценена их активность в клетках дрожжей. В качестве тест-систем оценки активности вариантов Cas9 апробированы несколько дрожжевых моделей, использующих репортерные гены метаболизма урацила (*URA3*) и аденина (*ADE2*), а также ген искусственного хромобелка Tinsel (*tsPurple*) [24]. В тест-системе *ADE2* изучено влияние контекста хроматина на активность высокоточных форм Cas9.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Штаммы и условия роста. Активность вариантов Cas9 оценивали в клетках штамма BY4741 *S. cerevisiae* (*MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0*) (“Euroscarf”, Германия) и его производного BY4741Δ*trp* (BY4741 *trp1::URA3*), несущего замену кодирующей области гена *TRP1* на кодирующую область гена *URA3*. Молекулярное клонирование проводили с использованием хемокомпетентных клеток штамма XL1Blue (*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tetr)]*) (“Евроген”, Россия). Дрожжи трансформировали по стандартному протоколу с использованием ацетата лития [25]. Редактированные по гену *ADE2* колонии дрожжей выращивали на селективной среде, содержащей 6.7 г/л YNB (yeast nitrogen base w/o amino acids), 20 г/л глюкозы, 2 г/л смеси аминокислот (Drop-out mix) без лейцина, триптофана, гистидина и урацила, с добавлением гистидина и урацила в концентрации 100 мг/л и аденина в концентрации 1 мг/л. Колонии дрожжей, отредактированных по гену *URA3*, выращивали на селективной среде, содержащей 6.7 г/л YNB, 20 г/л глюкозы, 2 г/л Drop-out mix без лейцина, триптофана, гистидина и урацила, с добавлением гистидина и аденина в концентрации 100 мг/л. Колонии дрожжей штамма BY4741Δ*trp* – с заменой гена *URA3* на ген хромобелка Tinsel (*tsPurple*) – отбирали на искусственной селективной среде, содержащей 6.7 г/л YNB, 20 г/л глюкозы, 2 г/л Drop-out mix без урацила, с добавлением урацила до конечной концентрации 10 мкг/л и контрелективного агента 5-фторотетрациклиновой кислоты (5-FOA) до конечной концентрации 1 мг/л. Все компоненты питательных сред производства “Sigma-Aldrich” (Германия).

Получение штамма, несущего репортерный ген хромобелка Tinsel. Экспрессионную кассету гена *tsPurple* с участками, комплементарными обла-

стям, фланкирующим ген *URA3* в штамме BY4741 Δ *trp*, амплифицировали с праймерами TRP1-Tinsel-rec-F и TRP1-Tinsel-rec-R (табл. 1) с плазмиды pTEF-Tinsel Purple (“ATUM”, США) (табл. 2). Полученным ПЦР-продуктом трансформировали штамм BY4741 Δ *trp*. Колонии дрожжевых трансформантов выращивали на искусственной селективной среде, содержащей контрольный селективный агент 5-FOA. Наличие вставки гена *tsPurple* в геномной ДНК рекомбинатных штаммов дрожжей проверяли с помощью праймеров

TRP-ch-F1 и Tinsel-ch-R. Полученный штамм назвали WT-Tinsel.

Клонирование спейсеров гид-РНК. Последовательности спейсеров против генов *URA3* и *ADE2* *S. cerevisiae* использовали из литературных данных или подбирали с помощью онлайн-сервиса CRISPOR [28] (табл. 3). Длинные олигонуклеотиды, кодирующие спейсеры ScURA-PRP-F, ADE2-lit-RPR-F или ADE2-1-RPR (табл. 1), клонировали в вектор pRPR1_gRNA_handle_RPR1t, разрезанный по сайтам HindIII, с использовани-

Таблица 1. Олигонуклеотиды, использованные в работе

Название	Последовательность (5' → 3')
TRP1-URA3-rec-F	GTGAGTATACGTGATTAAGCACACAAAGGCAGCTTGGAGTATGTCGAAAGCTACAT-ATAAGGAACG
TRP1-URA3-rec-R	AGTGCACAAACAATACTTAAATAAATACTACTCAGTAATAACCTAGTTTTGCTGGCCG-CATCTTCTC
TRP-gn-ch-F	CAGATGGCAGTAGTGGAAGAT
TRP-gn-ch-R	GTAAAAGTCAACCCCTGCGATG
ADE2-lit-RPR-F*	GAGCTGCGATTGGCAGAAGCTT AATTGTAGAGACTATCCACAG TTTTAGAGCTAGAA-ATAGCAAG
ScURA-PRP-F*	GAGCTGCGATTGGCAGAAGCTT GAGTAAAAAATTGTA CTTGGGTTTTAGAGCTAGAA-ATAGCAAG
ADE2-1-RPR-F*	GAGCTGCGATTGGCAGAAGCTT AGTTACCCAAAGTGTTCCTG TTTTAGAGCTAGAA-ATAGCAAG
TRP1-Tinsel-rec-F	GTGAGTATACGTGATTAAGCACACAAAGGCAGCTTGGAGTATGGCATCTTTAGTCA-AAAAGGATATGT
TRP1-Tinsel-rec-R	AGTGCACAAACAATACTTAAATAAATACTACTCAGTAATAACCTAACCCAGTAGCCTTC-TCAGGTAC
TRP-ch-F1	GTAGTTATAAGAAAGAGACC
Tinsel-ch-R	GTGTACGTTCCCAAGTGAAGC
hCas9-NcoI-F	TACCAACAACCATGGACAAGAAGTACTCCATTGGG
hCas9-EcoRI-noNLS-R	CTCTCTCTTGAATTCAGCCCTGCTGTCTCCACCGAG
evo-Cas9-TEF1- M495V-F	CTGCCAGTCCATTCATCGAAAGGGTGACCAACTTCGATAAGAACCTGC
evo-Cas9-TEF1- M495V-R	GCAGGTTCTTATCGAAGTTGGTCACCCTTTTCGATGAAGGACTGGGCAGAG
evo-Cas9-TEF1-R661Q-F	CGGAGATACACCGGCTGGGGCCAGCTGTCAAGAAAAGTCAATGGGAT
evo-Cas9-TEF1-R661Q-R	ATCCCATTTGATCAGTTTTCTTGACAGCTGGCCCCAGCCGGTGTATCTCCG
HiFi-Cas9-F	GTCCGATGGATTTGCCAACGCTAACTTCATGCAAG
HiFi-Cas9-R	GTCATCATGGATCAACTGCATGAAGTTAGCGTTGGCAA
TAG-ADE-for	GGTTTAGTGTTTTCTTACCCAATTGTATAGACTATCCACAAGACAATATTTG
TAG-ADE-rev	GAACGGAGTCCGGAACCTAGCAGGCGCATAACATAAGTCACAAATATTGTCTTGTG
ADE2-1,2-mut-F	AGAGCATTAAATCAAAAATGGTATAGCAGTTACCCAAAGTTGACCTGTAACAAGCCA-GTGAGACGTCCCT
ADE2-1,2-mut-R	AGTCCTCGACTTCAAGACGAATGGAAAACCCAAATCTCTTAACATTACAATAGGGAC-GTCTCACTGGCTT
URA-TEMPL-F	GATTTTTCCATGGAGGGCACAGTTAAGCCGCTAAAGGCATTATAAGCCAAGTAC
URA-TEMPL-R	GTATTACCAATGTCAGCAAATTTCTGTCTTCGAAGAGTAAAAAATTGTACTTGGCT-TATAATGCC

* Жирным шрифтом с подчеркиванием выделены последовательности спейсеров.

Таблица 2. Плазмиды, использованные в работе

Название	Назначение	Источник
p414-TEF1p-Cas9-CYC1t	Низкокопийная центромерная дрожжевая экспрессионная плаزمида, кодирующая Cas9 дикого типа (с оптимизированной под клетки человека экспрессией)	[26]
pRPR1_gRNA_handle_R-PR1t	Высококопийный (2μ) дрожжевой шаттл-вектор, кодирующий структурную часть гид-РНК	[27]
pTEF-Tinsel Purple	Высококопийный (2μ) дрожжевой вектор, экспрессирующий хромобелок Tinsel	ATUM (Newark, США)
pX-evoCas9	Плазмида, экспрессирующая в клетках млекопитающих высокоточный вариант evoCas9	[13]
p414-Cas9-PstI	Плазмида, производная от p414-TEF1p-Cas9-CYC1t, с удаленной внутренней частью гена <i>cas9</i> по сайтам PstI	Эта работа
pRPR1_gRNA_ADE2-lit	Вектор pRPR1_gRNA_handle_RPR1t, кодирующий гид-РНК со спейсером против гена <i>ADE2</i>	Эта работа
pRPR1_gRNA_ADE2-1	Вектор pRPR1_gRNA_handle_RPR1t, кодирующий гид-РНК со спейсером-1 против гена <i>ADE2</i>	Эта работа
pRPR1_gRNA_URA3	Вектор pRPR1_gRNA_handle_RPR1t, кодирующий гид-РНК против гена <i>URA3</i>	Эта работа
p414-evoCas9	Плазмида p414-TEF1p-Cas9-CYC1t, экспрессирующая evoCas9	Эта работа
p414-evoCas9 GR/VA	Плазмида p414-TEF1p-Cas9-CYC1t, экспрессирующая evoCas9 с нецелевыми заменами G453R и V856A	Эта работа
p414-HiFiCas9	Плазмида p414-TEF1p-Cas9-CYC1t, экспрессирующая HiFiCas9	Эта работа

Таблица 3. Последовательности спейсеров гид-РНК против генов *URA3* и *ADE2*

Название	Последовательность (5' → 3')	Источник
antiURA3	GAGTAAAAAATTGTA CT TGG	[29]
ADE2-lit	AATTGTAGAGACTATCCACA	[30]
ADE2-1	AGTTACCCAAAGTGTTCTG	Эта работа

ем ферментативной сборки с набором Gibson Assembly Master Mix (“NEB”, США). Полученными смесями трансформировали штамм XL-blue1 *Escherichia coli*. Корректность полученных плазмид проверяли с помощью секвенирования.

Клонирование генов высокоточных вариантов Cas9. Плазмиды, кодирующие высокоточные формы Cas9 (evoCas9 и HiFiCas9), получали ранее описанным методом рекомбинационного клонирования [23]. Вкратце, ПЦР-фрагменты, несущие заданные мутации в гене *cas9* (evo-*cas9* [13] или HiFi-*cas9* [12]), амплифицировали с помощью высокоточной полимеразы КАРА-HiFi (“Roche”, Швейцария) согласно табл. 4. Плазмиду p414-Cas9-PstI линеаризовали по сайту PstI, объединяли с полученными ПЦР-фрагментами, трансформировали в штамм BY4741Δ*trp* *S. cerevisiae* и растили на селективной среде без триптофана. Из отдельных колоний выделяли суммарную ДНК и трансформировали компетентные клетки *E. coli*

штамма XL-blue1. Правильность сборки плазмид проверяли при помощи ПЦР с колоний *E. coli*. Из отобранных колоний выделяли плазмидную ДНК и проверяли наличие целевых мутаций и отсутствие иных мутаций в генах *cas9* путем секвенирования.

Редактирование целевых генов дрожжей. Штамм BY4741Δ*trp* *S. cerevisiae* трансформировали смесью плазмид (по 1 мкг каждой), кодирующих мутантную форму Cas9 и гид-РНК; также смесь содержала донорный фрагмент ДНК (0.5 мкг) для репарации двухцепочечного разрыва, вносимого Cas9-нуклеазой, и введения стоп-кодона в белоккодирующую последовательность целевого гена. Донорные фрагменты получали путем отжига и достройки пар олигонуклеотидов TAG-ADE-for/TAG-ADE-rev и ADE2-1,2-mut-F/ADE2-1,2-mut-R для инактивации гена *ADE2* и URA-TEMPL-F/URA-TEMPL-R для инактивации гена *URA3*.

Таблица 4. ПЦР-фрагменты, использованные при рекомбинационном клонировании генов высокоточных вариантов *evoCas9* и *HiFiCas9*

Целевая плаزمид	Праймеры	Матрица	Размер ПЦР-продукта, п.н.
p414- <i>evoCas9</i>	hCas9-NcoI-F; evo-Cas9-TEF1- M495V-R	p414-TEF1p-Cas9-CYC1t	1518
p414- <i>evoCas9</i>	evo-Cas9-TEF1-M495V-F; evo-Cas9-TEF1-R661Q-R	pX- <i>evoCas9</i>	552
p414- <i>evoCas9</i>	evo-Cas9-TEF1-R661Q-F; hCas9-EcoRI-noNLS-R	p414-TEF1p-Cas9-CYC1t	2169
p414- <i>HiFiCas9</i>	hCas9-NcoI-F; HiFi-Cas9-R	p414-TEF1p-Cas9-CYC1t	2111
p414- <i>HiFiCas9</i>	HiFi-Cas9-F; hCas9-EcoRI-noNLS-R	p414-TEF1p-Cas9-CYC1t	2077

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Использование *URA3* в качестве репортерного гена в тест-системе для оценки активности *Cas9*

Ключевой момент при создании тест-системы по оценке активности *Cas9* – выбор репортерного гена, по эффективности редактирования которого можно судить об активности этой нуклеазы. В генетических манипуляциях с дрожжами *S. cerevisiae* часто используют ауксотрофные маркеры – как правило, это гены метаболизма аминокислот и нуклеотидов [31]. Одним из наиболее часто используемых ауксотрофных маркеров служит ген биосинтеза пиримидиновых оснований *URA3*, кодирующий оротидин-5'-фосфатдекарбоксилазу. Инактивация *URA3* под действием какого-либо мутагена ведет к неспособности клеток формировать колонии на питательной среде без урацила. Таким образом, представляется разумным создание тест-системы, в которой активность *Cas9* обратно пропорциональна количеству колоний мутантных дрожжей, выросших на селективной среде, не содержащей урацила. Схема эксперимента по оценке нуклеазной активности *Cas9* относительно гена *URA3* представлена на рис. 1а. После котрансформации гаплоидного штамма BY4741 Δtrp , ауксотрофного по триптофану и лейцину (для поддержания плазмид, кодирующих *Cas9* и гид-РНК соответственно) и прототрофного по урацилу (интактный ген *URA3*), с помощью плазмид p414-TEF1p-Cas9-CYC1t и pRPR1_gRNA_ADE2-lit (табл. 2) колонии выращивали на селективной питательной среде, содержащей или не содержащей урацил. В трансформации дрожжей использовали также короткий донорный фрагмент длиной 100 п.н., вносящий стоп-кодон внутри рамки считывания гена *URA3*. Ожидали, что *Cas9* за счет спейсера anti-*URA3* распознает мишень в гене *URA3* и внесет двухцепочечный разрыв. В ходе репарации повреждения ДНК клеточные системы будут преимущественно использовать донорный фрагмент [32, 33], что приведет к инактивации ге-

на *URA3* из-за стоп-кодона в доноре. В случае высокоактивного варианта *Cas9* ожидали полную инактивацию *URA3* и, как следствие, формирование лишь незначительного числа колоний или их полное отсутствие. В случае слабоактивного варианта *Cas9* ожидали, что клетки уклонятся от действия нуклеазы, это приведет к сохранению последовательности *URA3* и формированию относительно большого числа колоний.

Согласно результатам, полученным в случае *Cas9* дикого типа (рис. 1б), при выращивании колоний в отсутствие гид-РНК образуется несколько сотен колоний (в среднем 760 ± 244 и 498 ± 314 на среде с добавлением и без урацила соответственно). В присутствии гид-РНК, но в отсутствие донора из-за *Cas9*-опосредованного повреждения гена *URA3* наблюдается формирование единичных колоний или их полное отсутствие, что подтверждает летальность двухцепочечных разрывов, вызванных *Cas9*, для гаплоидного штамма, используемого в экспериментах. В присутствии одновременно *Cas9*, гид-РНК и донора наблюдаются различия в количестве выросших колоний в зависимости от того, присутствует ли в питательной среде урацил или нет: наименьшее число колоний образуется на среде без добавления урацила и несколько десятков колоний вырастает на среде с урацилом. Полученные результаты можно объяснить тем, что донор, нейтрализуя негативный эффект двухцепочечного разрыва, вносимого *Cas9*, все равно инактивирует ген *URA3* из-за стоп-кодона. Отсюда понятно, что на питательной среде без урацила наличие донора в любом случае не способствует выживанию дрожжей, а на среде с урацилом донор способствует выживанию дрожжей за счет снижения токсичности двухцепочечных разрывов. С целью повысить зависимость образования колоний именно от активности *Cas9* в следующем эксперименте дрожжевые трансформанты растили на питательной среде без урацила.

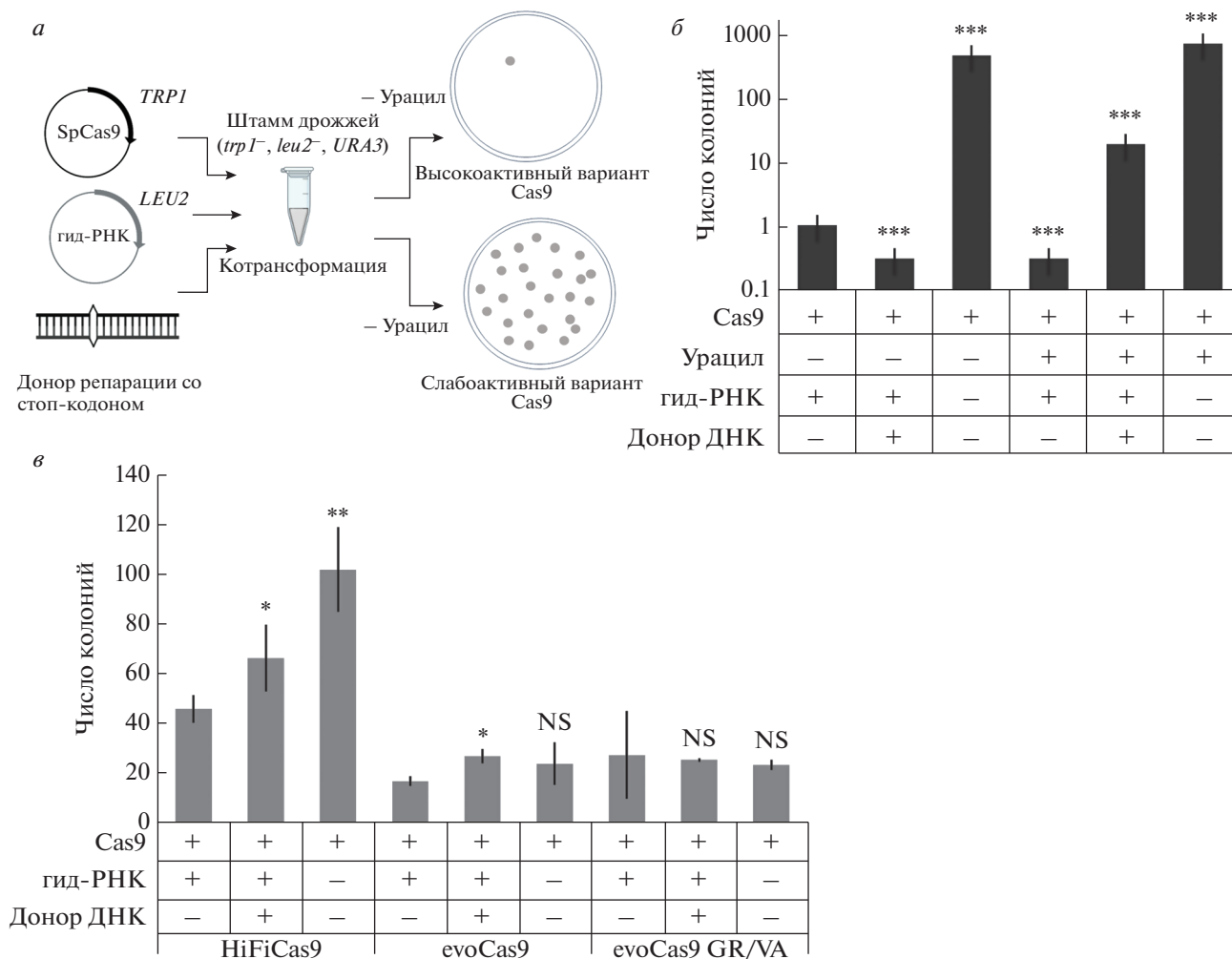


Рис. 1. Использование *URA3* в качестве репортерного гена в тест-системе для оценки активности вариантов Cas9. *а* – Схема эксперимента. *б* – Оценка активности Cas9 дикого типа в тест-системе с *URA3*. *в* – Оценка активности высокоточных вариантов Cas9 в тест-системе с *URA3*. Данные представлены в виде среднего в трех независимых экспериментах. Разброс представлен стандартным отклонением. Статистическая значимость различий в средних определена с помощью *t*-критерия Стьюдента: NS – статистически незначимые различия, * $0.05 > p > 0.01$, ** $0.01 > p > 0.001$, *** $p < 0.001$.

В тест-системе оценили активность высокоточных производных Cas9, таких как HiFiCas9 и evoCas9, а также мутантного варианта – evoCas9 GR/VA – с нецелевыми заменами G453R и V856A, полученного в результате случайного мутагенеза. В этом случае даже в отсутствие гид-РНК наблюдалась низкая эффективность трансформации дрожжей (порядка 20–30 колоний, рис. 1в). В случае вариантов evoCas9 не обнаружено существенной зависимости образования колоний от наличия гид-РНК и донора. В случае варианта HiFiCas9 наблюдали статистически значимое снижение числа колоний в присутствии Cas9 и гид-РНК. Отметим, что образовавшихся колоний было примерно на порядок меньше, чем в случае нуклеазы дикого типа, из чего можно сделать вывод о сниженной активности HiFiCas9 по сравнению с Cas9.

Можно заключить, что тест-система с репортерным геном *URA3* позволяет исследовать зависимость колониеобразования от активности исследуемых вариантов Cas9, но она может быть искажена возможной более или менее высокой цитотоксичностью разных вариантов Cas9. Следовательно, подобная тест-система не может служить инструментом для адекватной оценки нуклеазной активности различных вариантов Cas9.

Использование гена хромобелка *Tinsel* в качестве репортерного в тест-системе для оценки активности Cas9

Наиболее адекватными тест-системами для оценки активности вариантов Cas9 считают такие, в которых при редактировании репортерных генов происходит изменение окраски дрожжевых

колоний. В подобных системах активность проверяемых вариантов Cas9 оценивают не по общему числу колоний, а по доле колоний с измененной окраской, тем самым нивелируя влияние побочных факторов, понижающих жизнеспособность дрожжевых колоний. Чтобы снизить потенциальную цитотоксичность, связанную с нарушением функций внутренних дрожжевых генов, в качестве цветного репортера выбрали искусственный ген, кодирующий пурпурный белок Tinsel, или tsPurple, который при экспрессии с высококопийной плазмиды под контролем сильного промотора гена *TEF1* окрашивает дрожжевые колонии в розовый цвет (*данные не приведены*). Мы предположили, что инактивация гена *tsPurple* при Cas9-опосредуемом мутагенезе приведет к исчезновению розовой окраски колонии. Использование гена *tsPurple* в составе высококопийной плазмиды, скорее всего, даст ложнонегативные результаты, что обусловлено инактивацией лишь части копий репортерного гена. На основании вышеизложенного мы получили штамм WT-Tinsel (производный от BY4741 Δ *trp*) с одной копией гена *tsPurple*, находящейся под контролем промотора гена *TEF1* и встроенной в локус *TRP1* вместо гена *URA3*. Однако у полученного штамма WT-Tinsel розового окрашивания колоний не наблюдали. По-видимому, при снижении числа копий гена хромобелок не накапливается в количестве, достаточном для окрашивания колонии. Следовательно, бактериальный хромобелок Tinsel не может служить надежным репортером в этой системе.

Использование ADE2 в качестве репортерного гена в тест-системе для оценки активности Cas9

Более надежным способом влияния на окраску дрожжевых колоний может быть использование ферментов. С этой целью наиболее часто используется путь *de novo* биосинтеза пуринов [34]. Нарушение функционирования фермента, кодируемого геном *ADE2*, ведет к накоплению пигмента, окрашивающего дрожжевые колонии в красный цвет. *ADE2* не важен для жизнедеятельности дрожжей и его полная инактивация ведет к ауксотрофности по аденину. Отметим, что в первой работе, где была продемонстрирована применимость системы CRISPR/Cas9 для редактирования генома *S. cerevisiae*, одной из мишеней служил ген *ADE2* [26].

В тест-системе, использующей *ADE2* в качестве репортера, мерой активности Cas9 служит доля красных колоний: чем она выше, тем более активен исследуемый вариант нуклеазы (рис. 2а). Наиболее эффективный спейсер против *ADE2* был выбран в ходе сравнения результатов экспериментов по редактированию *ADE2*, описанных в литературе [26, 29, 35, 36]. Кроме того, последовательности спейсеров анализировали с помощью

программы CRISPOR [28] и учитывали возможное влияние структуры хроматина, используя данные о картировании положения нуклеосом в *S. cerevisiae* [37]. Наиболее эффективный спейсер обозначили как ADE2-lit (см. табл. 3). Помимо ADE2-lit выполнили дизайн менее эффективного спейсера, обозначенного как ADE2-1. Как и в случае тест-системы с *URA3*, при редактировании использовали донорные фрагменты ДНК, вносящие стоп-кодона, а также сдвиг рамки считывания -1 (в качестве РАМ-блокирующей мутации) в участок Cas9-мишени в гене *ADE2*.

На рис. 2б представлены фотографии чашек Петри с колониями дрожжей, отредактированными по гену *ADE2* с использованием Cas9 дикого типа (правая панель) и высокоточного варианта evoCas9 (левая панель). Можно отметить, что в случае белка дикого типа доля красных колоний значительно выше, чем для evoCas9. Кроме того, воспроизводимо наблюдали, что в случае слабоактивных вариантов: evoCas9 и evoCas9 GR/VA — образуется в десятки раз больше колоний, чем для более активных HiFiCas9 и Cas9. Это указывает на высокую цитотоксичность активных вариантов, по-видимому, благодаря их способности эффективно вносить двухщепочечные разрывы ДНК — как целевые, так и нецелевые. Количественные данные по доле красных колоний представлены на рис. 2в. Согласно полученным результатам, средняя активность Cas9 в тест-системе *ADE2* составляет $83.0 \pm 7.8\%$, пониженный уровень зарегистрирован для HiFiCas9 — $52.2 \pm 3.9\%$, тогда как минимальную активность, как и в случае с тест-системой *URA3*, проявляют evoCas9 и evoCas9 GR/VA: 0.28 и 0.23% соответственно. В ходе секвенирования отредактированных участков *ADE2* во всех шести проверенных красных колониях обнаружены целевые нонсенс-мутации: замена кодона 211, кодирующего остаток глутаминовой кислоты, на стоп-кодон TAG и делеция G в мотиве РАМ, которая ведет к сдвигу -1 рамки считывания в *ADE2*. В то же время во всех проверенных белых колониях обнаружена последовательность дикого типа.

На основании полученных результатов можно предположить, что низкая активность Cas9-редакторов дает возможность клеткам избежать действия системы CRISPR/Cas9. Кроме того, обращает на себя внимание относительно невысокий разброс в данных между повторами экспериментов в сравнении с разбросами, полученными в системе с геном *URA3*. По-видимому, доля окрашенных колоний как мера оценки активности Cas9 более устойчива к колебаниям общего числа образовавшихся колоний. Таким образом, тест-система с геном *ADE2* позволяет более надежно и адекватно оценивать активность Cas9-редакторов по сравнению с другими исследованными нами репортерными генами.

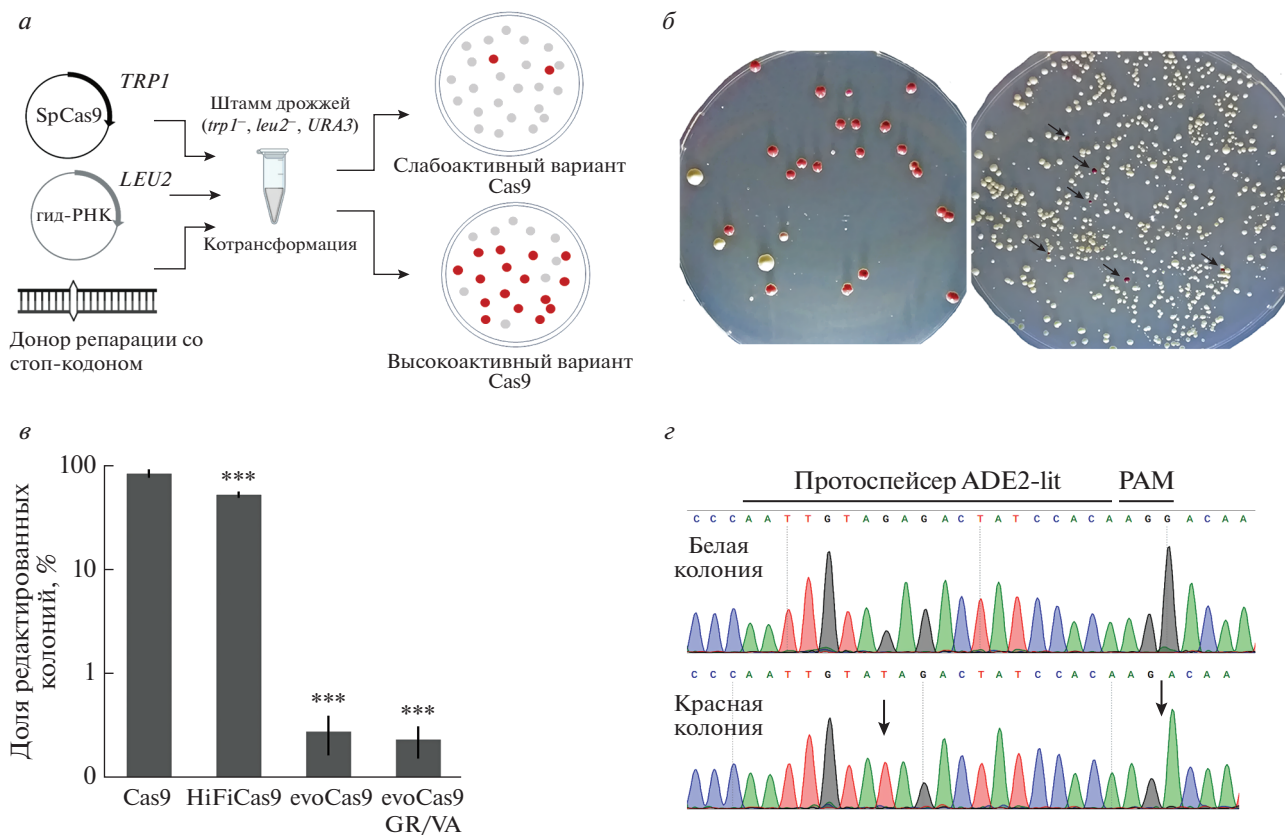


Рис. 2. Оценка активности вариантов Cas9 с использованием высокоэффективного спейсера против *ADE2*. *а* – Схема эксперимента. *б* – Оценка активности вариантов Cas9 с высокоэффективным спейсером ADE2-lit. Данные представлены в виде среднего для трех независимых экспериментов. Разброс представлен стандартным отклонением. Статистическая значимость различий в средних определена с помощью *t*-критерия Стьюдента: *** $p < 0.001$. *в* – Оценка активности вариантов Cas9 с высокоэффективным спейсером ADE2-lit. Данные представлены в виде среднего для трех независимых экспериментов. Разброс представлен стандартным отклонением. Статистическая значимость различий в средних определена с помощью *t*-критерия Стьюдента: *** $p < 0.001$. *г* – Репрезентативные фотографии чашек Петри с колониями дрожжей, редактированными Cas9 дикого типа (правое фото) и evoCas9 (левое фото, стрелками указаны красные колонии). *д* – Сравнение последовательностей ДНК в мишени *ADE2* в белой и красной колониях. Стрелками указаны положения мутаций: замена G→T, приводящая к изменению кодона Glu на стоп-кодон TAG, и делеция G в мотиве PAM, блокирующая дальнейшее действие Cas9 на отредактированный участок.

Эффективность спейсера зависит от положения относительно нуклеосом в редактируемом гене

Помимо высокоэффективного спейсера ADE2-lit в оценке активности вариантов Cas9 использовали второй спейсер, обозначенный как ADE2-1. Ожидалось, что эффективность этого спейсера будет ниже ADE2-lit, так как он находится близко от центра +3 нуклеосомы ADE2, в то время как ADE2-lit – на краю +5 нуклеосомы, которая к тому же слабее ассоциирована с ДНК, чем +3 нуклеосома (рис. 3а).

Согласно полученным результатам, все варианты Cas9 проявляют пониженную активность в отношении спейсера ADE2-1 (рис. 3б). Средняя активность Cas9 составила $71.0 \pm 15.0\%$, то есть снизилась по сравнению со спейсером ADE2-lit на 12%; активность HiFiCas9 снизилась в 6.3 раза и составила $8.3 \pm 1.1\%$, а evoCas9 и evoCas9 GR/VA – в

4.7 и 3.3 раза соответственно, составив 0.06 и 0.07%. На основании полученных данных можно говорить об относительно слабом влиянии нуклеосом на активность Cas9 дикого типа и сильном негативном влиянии нуклеосом на активность его высокоточных производных. Таким образом, тест-система с геном *ADE2* дает возможность детально исследовать влияние структуры хроматина на активность вариантов Cas9.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В рамках создания дрожжевой тест-системы для оценки активности вариантов нуклеазы Cas9 в качестве репортерных генов охарактеризованы гены метаболизма урацила (*URA3*) и аденина (*ADE2*), а также ген искусственного хромобелка Tinsel (*tsPurple*). Полученные результаты указывают на надежность и адекватность тест-системы с

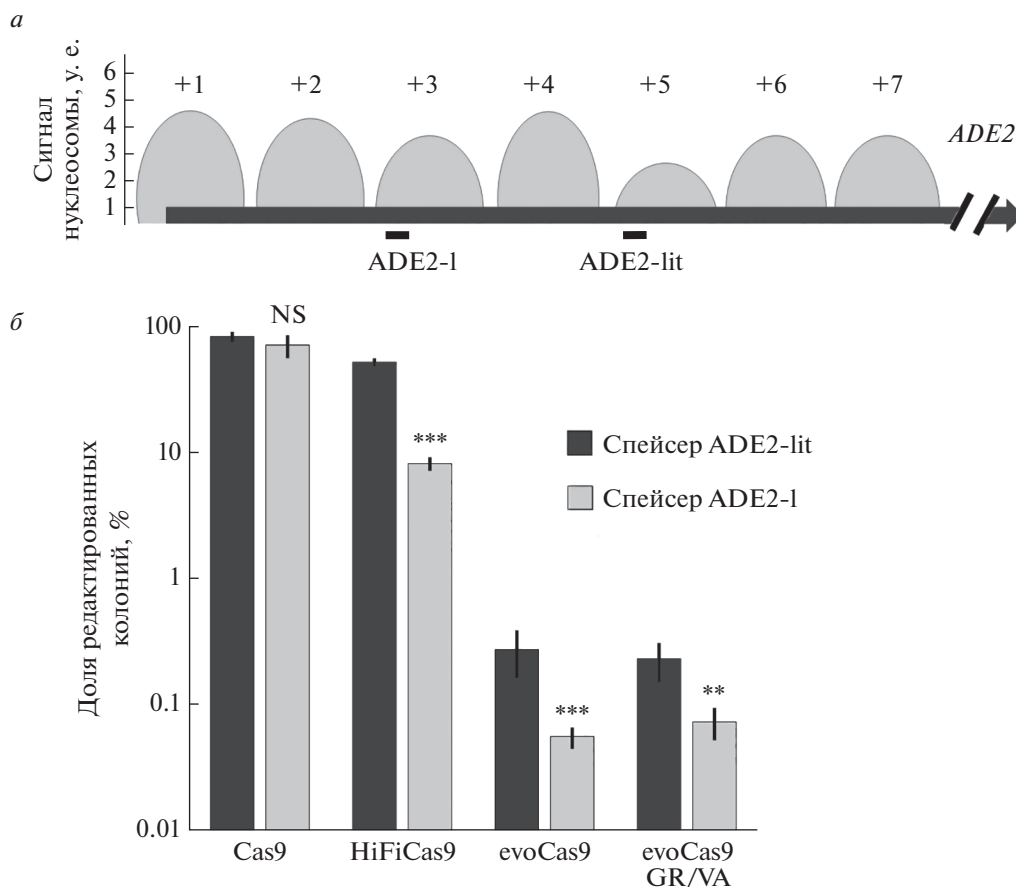


Рис. 3. Положение спейсеров относительно нуклеосом влияет на эффективность редактирования *ADE2*. *а* – Схема расположения первых 7 нуклеосом в кодирующей области гена *ADE2*. По оси ординат отложен уровень сигнала, полученного путем выделения и секвенирования нуклеосомной ДНК, который прямо пропорционален силе взаимодействия гистонового октамера с нуклеосомной ДНК [37]. Высота схематично изображенных нуклеосом отражает уровень этого сигнала. Показано расположение спейсеров ADE2-1 и ADE2-lit относительно нуклеосом. *б* – Оценка активности вариантов Cas9 с использованием спейсеров ADE2-lit и ADE2-1. Статистическая значимость различий в средних определена с помощью *t*-критерия Стьюдента: NS – различия статистически незначимы, $0.01 > p > 0.001$, $***p < 0.001$.

геном *ADE2*. В полученной тест-системе показано негативное влияние структуры хроматина на активность высокоточных производных Cas9.

В настоящее время разработано несколько тест-систем для оценки активности мутантных производных Cas9 *in vivo* в различных организмах. Так, в клетках млекопитающих в качестве репортеров используют флуоресцентные белки и оценивают активность вариантов Cas9 по снижению интенсивности свечения в редактируемых клетках [38]. Интересен пример тест-системы с конверсией зеленого флуоресцентного белка в синий (за счет внесения замены Y66H), в которой методом проточной цитометрии оценивают долю клеток с конвертированным флуоресцентным белком [39, 40]. Следует отметить, что у млекопитающих система репарации двухцепочечных разрывов ДНК по механизму NHEJ на порядок активнее, чем система гомологичной рекомбина-

ции [41], поэтому и доля редактированных клеток с конвертированным флуоресцентным белком обычно небольшая (около 10%), а доля клеток с репортерным геном, поврежденным системой NHEJ, в несколько раз выше. Следовательно, подобная тест-система очень чувствительна к уровню активности системы гомологичной рекомбинации. Кроме того, использование репортерных систем млекопитающих с флуоресцентными белками требует применения дорогостоящего оборудования и подобные системы хорошо подходят для анализа активности единичных белков, но теряют эффективность при масштабировании задачи.

Масштабный анализ мутантных вариантов Cas9 впервые реализован в системе двойной селекции *E. coli* при получении Cas9 с измененной PAM-специфичностью [42], а также более точного варианта HiFiCas9 [12]. В этой системе *E. coli* трансформировали библиотекой плазмид, коди-

рующих мутантные варианты Cas9. Вырастали только те колонии, в которых за счет высокой целевой активности нуклеаза Cas9 инактивировала плазмиду, несущую ген токсина (*ccdB*), а за счет высокой специфичности не повреждала плазмиду с геном устойчивости к антибиотику карбеницилину. Однако у бактерий, в отличие от эукариот, отсутствует выраженная структура хроматина, поэтому невозможен отбор вариантов Cas9 по увеличению активности в контексте хроматина. В связи с этим важно подчеркнуть, что в разработанной нами системе HiFiCas9 обладает выраженной чувствительностью к структуре хроматина.

Аналогичная высокопроизводительная система двойной селекции библиотеки мутантных вариантов Cas9 реализована в клетках *S. cerevisiae* при получении высокоточной формы evoCas9 [13]. В этой системе активность мутантов Cas9 оценивали по восстановлению прототрофности к триптофану за счет Cas9-индуцируемой репарации поврежденного гена *TRP1* по механизму гомологичной рекомбинации. Специфичность оценивали по доле красных колоний, формирующихся при использовании Cas9 мутантами несовершенных спейсеров, отличающихся на один нуклеотид от мишени в гене *ADE2*. Следует отметить, что отбор вариантов Cas9 по признаку выживаемости колоний (как нами показано в случае гена *URA3*) не может служить надежным способом оценки активности. Следовательно, можно сказать, что в данной системе авторы адекватно оценивали только специфичность вариантов Cas9. Действительно, evoCas9 – самый специфичный Cas9-мутант, хотя полученные нами и другими авторами [14] данные свидетельствуют о том, что у него самая низкая активность как в дрожжах, так и в клетках млекопитающих.

Таким образом, полученная нами тест-система редактирования генома с геном *ADE2* в качестве репортера может быть использована для разработки активных мутантных форм нуклеазы Cas9 с учетом влияния структуры хроматина, а также для оценки специфичности вариантов Cas9 в сочетании с несовершенными спейсерами.

Авторы выражают благодарность Центру высокоточного редактирования генома и генетических технологий для биомедицины ИМБ РАН за предоставленные вычислительные мощности и методики для анализа данных.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 22-14-00377.

Работа выполнена с использованием оборудования центра коллективного пользования “Геном” ИМБ РАН (http://www.eimb.ru/ru1/ckp/scu_genome_se.php).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E. (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. **337**, 816–821.
- Hsu P.D., Lander E.S., Zhang F. (2014) Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*. **157**, 1262–1278.
- Jiang F., Doudna J.A. (2017) CRISPR–Cas9 structures and mechanisms. *Annu. Rev. Biophys.* **46**, 505–529.
- Xue C., Greene E.C. (2021) DNA repair pathway choices in CRISPR-Cas9-mediated genome editing. *Trends Genet.* **37**, 639–656.
- Jacinto F. V., Link W., Ferreira B.I. (2020) CRISPR/Cas9-mediated genome editing: from basic research to translational medicine. *J. Cell. Mol. Med.* **24**, 3766–3778.
- Mali P., Aach J., Stranges P.B., Esvelt K.M., Moosburner M., Kosuri S., Yang L., Church G.M. (2013) Cas9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. *Nat. Biotechnol.* **31**, 833–838.
- Zhang X.-H., Tee L.Y., Wang X.-G., Huang Q.-S., Yang S.-H. (2015) Off-target effects in CRISPR/Cas9-mediated genome engineering. *Mol. Ther. Nucleic Acids*. **4**, e264.
- Slaymaker I.M., Gao L., Zetsche B., Scott D.A., Yan W.X., Zhang F. (2016) Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science*. **351**, 84–88.
- Bao Z., Xiao H., Liang J., Zhang L., Xiong X., Sun N., Si T., Zhao H. (2015) Homology-integrated CRISPR–Cas (HI-CRISPR) system for one-step multigene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *ACS Synth. Biol.* **4**, 585–594.
- Kleinstiver B.P., Pattanayak V., Prew M.S., Tsai S.Q., Nguyen N.T., Zheng Z., Joung J.K. (2016) High-fidelity CRISPR–Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature*. **529**, 490–495.
- Chen J.S., Dagdas Y.S., Kleinstiver B.P., Welch M.M., Sousa A.A., Harrington L.B., Sternberg S.H., Joung J.K., Yildiz A., Doudna J.A. (2017) Enhanced proofreading governs CRISPR–Cas9 targeting accuracy. *Nature*. **550**, 407–410.
- Vakulskas C.A., Dever D.P., Rettig G.R., Turk R., Jacobi A.M., Collingwood M.A., Bode N.M., McNeill M.S., Yan S., Camarena J., Lee C.M., Park S.H., Wiebking V., Bak R.O., Gomez-Ospina N., Pavel-Dinu M., Sun W., Bao G., Porteus M.H., Behlke M.A. (2018) A high-fidelity Cas9 mutant delivered as a ribonucleoprotein complex enables efficient gene editing in human hematopoietic stem and progenitor cells. *Nat. Med.* **24**, 1216–1224.
- Casini A., Olivieri M., Petris G., Montagna C., Reginato G., Maule G., Lorenzin F., Prandi D., Romanel A., Demichelis F., Inga A., Cereseto A. (2018) A highly specific SpCas9 variant is identified by *in vivo* screening in yeast. *Nat. Biotechnol.* **36**, 265–271.

14. Schmid-Burgk J.L., Gao L., Li D., Gardner Z., Streckler J., Lash B., Zhang F. (2020) Highly parallel profiling of Cas9 variant specificity. *Mol. Cell.* **78**, 794–800. e8.
15. Lee J.K., Jeong E., Lee J., Jung M., Shin E., Kim Y., Lee K., Jung I., Kim D., Kim S., Kim J.-S. (2018) Directed evolution of CRISPR-Cas9 to increase its specificity. *Nat. Commun.* **9**, 3048.
16. Zischewski J., Fischer R., Bortesi L. (2017) Detection of on-target and off-target mutations generated by CRISPR/Cas9 and other sequence-specific nucleases. *Biotechnol. Adv.* **35**, 95–104.
17. Ломов Н.А., Вьюшков В.С., Петренко А.П., Сыркина М.С., Рубцов М.А. (2019) Методы оценки эффективности работы систем CRISPR/Cas при геномном редактировании. *Молекуляр. биология.* **53**, 982–997.
<https://doi.org/10.1134/S0026893319060116>
18. Anders C., Jinek M. (2014) *In vitro* enzymology of Cas9. *Methods Enzymol.* **546**, 1–20.
19. Fu B.X.H., St. Onge R.P., Fire A.Z., Smith J.D. (2016) Distinct patterns of Cas9 mismatch tolerance *in vitro* and *in vivo*. *Nucleic Acids Res.* **44**, 5365–5377.
20. Yarrington R.M., Verma S., Schwartz S., Trautman J.K., Carroll D. (2018) Nucleosomes inhibit target cleavage by CRISPR-Cas9 *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **115**, 9351–9358.
21. Uusi-Mäkelä M.I.E., Barker H.R., Bäuerlein C.A., Häkkinen T., Nykter M., Rämetsä M. (2018) Chromatin accessibility is associated with CRISPR-Cas9 efficiency in the zebrafish (*Danio rerio*). *PLoS One.* **13**, e0196238.
22. Raymond C.K., Pownder T.A., Sexson S.L. (1999) General method for plasmid construction using homologous recombination. *Biotechniques.* **26**, 134–141.
23. Spasskaya D.S., Kotlov M.I., Lekanov D.S., Tutyaeva V.V., Snezhkina A.V., Kudryavtseva A.V., Karpov V.L., Karpov D.S. (2021) CRISPR/Cas9-mediated genome engineering reveals the contribution of the 26S proteasome to the extremophilic nature of the yeast *Debaryomyces hansenii*. *ACS Synth. Biol.* **10**, 297–308.
24. Liljeruhm J., Funk S.K., Tietscher S., Edlund A.D., Jamal S., Wistrand-Yuen P., Dyrhage K., Gynnå A., Ivermark K., Lövgren J., Törnblom V., Virtanen A., Lundin E.R., Wistrand-Yuen E., Forster A.C. (2018) Engineering a palette of eukaryotic chromoproteins for bacterial synthetic biology. *J. Biol. Eng.* **12**, 8.
25. Gietz R.D., Schiestl R.H. (2007) High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nat. Protoc.* **2**, 31–34.
26. 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. *Nucleic Acids Res.* **41**, 4336–4343.
27. Farzadfard F., Perli S.D., Lu T.K. (2013) Tunable and multifunctional eukaryotic transcription factors based on CRISPR/Cas. *ACS Synth. Biol.* **2**, 604–613.
28. Concordet J.-P., Haeussler M. (2018) CRISPOR: intuitive guide selection for CRISPR/Cas9 genome editing experiments and screens. *Nucleic Acids Res.* **46**, W242–W245.
29. Zhang G.-C., Kong I.I., Kim H., Liu J.-J., Cate J.H.D., Jin Y.-S. (2014) Construction of a quadruple auxotrophic mutant of an industrial polyploid *Saccharomyces cerevisiae* strain by using RNA-guided Cas9 nuclease. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**, 7694–7701.
30. Jakočiūnas T., Rajkumar A.S., Zhang J., Arsovska D., Rodriguez A., Jendresen C.B., Skjødtt M.L., Nielsen A.T., Borodina I., Jensen M.K., Keasling J.D. (2015) CasEMBLR: Cas9-facilitated multiloci genomic integration of *in vivo* assembled DNA parts in *Saccharomyces cerevisiae*. *ACS Synth. Biol.* **4**, 1226–1234.
31. Pronk J.T. (2002) Auxotrophic yeast strains in fundamental and applied research. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 2095–2100.
32. Dudášová Z., Dudáš A., Chovanec M. (2004) Non-homologous end-joining factors of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* **28**, 581–601.
33. Letavayová L., Marková E., Hermanská K., Vlčková V., Vlasáková D., Chovanec M., Brozmanová J. (2006) Relative contribution of homologous recombination and non-homologous end-joining to DNA double-strand break repair after oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair (Amst.)* **5**, 602–610.
34. Dorfman B.Z. (1969) The isolation of adenylosuccinate synthetase mutants in yeast by selection for constitutive behavior in pigmented strains. *Genetics.* **61**, 377–389.
35. Stovicek V., Borodina I., Forster J. (2015) CRISPR-Cas system enables fast and simple genome editing of industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Metab. Eng. Commun.* **2**, 13–22.
36. Degreif D., Kremenovic M., Geiger T., Bertl A. (2018) Preloading budding yeast with all-in-one CRISPR/Cas9 vectors for easy and high-efficient genome editing. *J. Biol. Methods.* **5**, e98.
37. Jiang C., Pugh B.F. (2009) A compiled and systematic reference map of nucleosome positions across the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Genome Biol.* **10**, R109.
38. Eki R., She J., Parlak M., Benamar M., Du K.-P., Kumar P., Abbas T. (2020) A robust CRISPR-Cas9-based fluorescent reporter assay for the detection and quantification of DNA double-strand break repair. *Nucleic Acids Res.* **48**, e126–e126.
39. Glaser A., McColl B., Vadolas J. (2016) GFP to BFP conversion: a versatile assay for the quantification of CRISPR/Cas9-mediated genome editing. *Mol. Ther. Nucleic Acids.* **5**, e334.
40. Idoko-Akoh A., Taylor L., Sang H.M., McGrew M.J. (2018) High fidelity CRISPR/Cas9 increases precise monoallelic and biallelic editing events in primordial germ cells. *Sci. Rep.* **8**, 15126.
41. Miyaoka Y., Berman J.R., Cooper S.B., Mayerl S.J., Chan A.H., Zhang B., Karlin-Neumann G.A., Conklin B.R. (2016) Systematic quantification of HDR and NHEJ reveals effects of locus, nuclease, and cell type on genome-editing. *Sci. Rep.* **6**, 23549.
42. Kleinstiver B.P., Prew M.S., Tsai S.Q., Topkar V. V., Nguyen N.T., Zheng Z., Gonzales A.P.W., Li Z., Peterson R.T., Yeh J.-R.J., Aryee M.J., Joung J.K. (2015) Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities. *Nature.* **523**, 481–485.

A Test System for Assessment of Activity of Mutant Cas9 Variants in *Saccharomyces cerevisiae*

D. S. Spasskaya^{1, *}, A. I. Davletshin², V. V. Tutyaeva¹,
K. A. Kulagin², D. G. Garbuz¹, and D. S. Karpov¹

¹Center for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Engelhardt Institute of Molecular Biology,
Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

²Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: drspssk@gmail.com

The key component of the *Streptococcus pyogenes* CRISPR/Cas revolutionary genome editing technology is the multidomain Cas9 protein. However, the specificity of Cas9 of wild type is not sufficiently high for editing large genomes of higher eukaryotes that limits the realization of the potential of genomic editing both in fundamental investigations and in the therapy of genetic diseases. The main way to obtain more specific variants of Cas9 is through mutagenesis followed by characterization of mutant proteins in *in vitro* or *in vivo* test systems. The *in vitro* and some *in vivo* test systems described in the literature are often labor-intensive and have scaling limitations, which make it challenging, in particular, to screen SpCas9 mutant variant libraries. In order to develop a simple method for high-throughput screening of Cas9 mutants *in vivo*, we characterized three test systems using CRISPR/Cas9-mediated inactivation of reporter genes, *tsPurple*, *ADE2*, and *URA3*, in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a model subject. We measured the activities of high-precision forms of Cas9, evoCas9 and HiFiCas9, and compared them with the wild-type one. The *ADE2* gene inactivation was found to be the most valid method for the evaluation of Cas9 activity. In developed test-system, the sensitivity to the chromatin structure was demonstrated for high-fidelity variants of Cas9, HiFiCas9. The proposed test-system can be applied in the development of new generation genome editors.

Keywords: Cas9, *URA3*, *ADE2*, genome editing, *Saccharomyces cerevisiae*