

РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОМА *Komagataella phaffii* С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИСТЕМЫ CRISPR/Cas9 ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ БЕЗМАРКЕРНОГО ШТАММА-ПРОДУЦЕНТА ФИТАЗЫ

© 2023 А.А. Ткаченко*, Л.Н. Борщевская, С.П. Синеокий, Т.Л. Гордеева

НИИ «Курчатовский институт»,
117545 Москва, Россия; электронная почта: artur.tka4enko10@gmail.com

Поступила в редакцию 19.04.2023

После доработки 19.04.2023

Принята к публикации 19.05.2023

На основе штамма *Komagataella phaffii* ВКПМ Y-4287 с высоким экспрессионным потенциалом с использованием системы CRISPR/Cas9 были разработаны штаммы-реципиенты *K. phaffii* ВКПМ Y-5013 (фенотип His⁻) и *K. phaffii* ВКПМ Y-5014 (фенотип Leu⁻), позволяющие на их основе получать безмаркерные штаммы-продуценты гетерологичных белков. Эффективность инактивации генов с использованием различных вариантов гидовых РНК (sgРНК) составила 65–98% для гена *HIS4* и 15–72% – для гена *LEU2*. Было показано, что полученные штаммы-реципиенты сохранили ростовые характеристики, присущие родительскому штамму *K. Phaffii* ВКПМ Y-4287, и высокий экспрессионный потенциал, оцененный по уровню продукции гетерологичного фермента фитазы из *Citrobacter gillenii*. Средняя продуктивность трансформантов, полученных на основе штаммов *K. phaffii* ВКПМ Y-5013 и *K. phaffii* ВКПМ Y-5014, была в 2,1 и 2,0 раза выше продуктивности трансформантов, полученных на основе коммерческого штамма *K. phaffii* GS115 соответственно. Предложен способ последовательной интеграции экспрессионной кассеты в геном штамма-реципиента *K. phaffii* ВКПМ Y-5013, и получен высокоэффективный многокопийный безмаркерный штамм-продуцент фитазы *C. gillenii*.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: CRISPR/Cas9, *Komagataella phaffii*, геномное редактирование, фитаза, *Citrobacter gillenii*.

DOI: 10.31857/S0320972523090130, EDN: WUVMUH

ВВЕДЕНИЕ

Фитазы (мио-инозитол-1,2,3,4,5,6-гексакисфосфат фосфогидролазы, ЕС 3.1.3.8 и 3.1.3.26) – ценные промышленные ферменты, широко применяющиеся в качестве кормовых добавок к комбикормам сельскохозяйственных животных и рыб.

Создание современных ферментных препаратов, содержащих фитазы, основано на использовании промышленных рекомбинантных штаммов-продуцентов. Наиболее привлекательным объектом для создания штаммов-продуцентов рекомбинантных белков являются метилотрофные дрожжи *Komagataella phaffii* благодаря их биобезопасности, легкости молекулярно-генетических манипуляций, мощным системам экспрессии генов и секреции

рекомбинантных белков, способности достигать высоких плотностей клеток при культивировании в минимальных средах [1]. В *K. phaffii* были экспрессированы фитазы таких микроорганизмов, как *Escherichia coli*, *Yersinia intermedia*, *Peniophora lycii*, *Shigella* sp. CD2, *Citrobacter freundii* и др. [2–6]. Однако применение в России зарубежных штаммов-реципиентов *K. phaffii* в коммерческих целях ограничено политикой распространения материала [7].

Для получения штаммов-продуцентов гетерологичных белков на основе прототрофных штаммов необходимо использование экспрессионных кассет, содержащих гены устойчивости к антибиотикам в качестве селективных маркеров. Отбор целевых антибиотикорезистентных штаммов требует добавления этих токсичных соединений в питательные среды,

Принятые сокращения: КЖ – культуральная жидкость; sgРНК – single guide РНК (единая направляющая, или гидовая РНК); РАМ – protospacer adjacent motif (мотив, расположенный рядом с протоспейсером).

* Адресат для корреспонденции.

что может негативно влиять на их клеточную функцию [8]. Кроме того, в промышленных биотехнологических производствах существуют ограничения на использование генов устойчивости к антибиотикам в штаммах-продуцентах с целью предотвращения их возможного нежелательного распространения среди микроорганизмов окружающей среды.

Таким образом, получение и использование в биотехнологическом производстве безмаркерных штаммов-продуцентов гетерологичных белков является актуальным и практически значимым.

Одним из подходов к получению многокопийных безмаркерных дрожжевых штаммов является использование систем сайт-специфической рекомбинации [9]. Существуют способы удаления селективных маркеров с использованием различных систем, например, Cre/loxP, FLP/FRT и др. Однако удаление фланкированных специфическими сайтами генетических элементов (селективных маркеров) с помощью таких систем в значительной мере является трудоемким и времязатратным процессом.

Еще одним подходом является получение штаммов-продуцентов на основе ауксотрофных штаммов с использованием экспрессионных кассет, содержащих селективные маркеры, способные восстанавливать прототрофность. Однако при таком подходе исключается возможность повторной многократной интеграции. Ауксотрофные штаммы возможно получить либо с помощью неспецифического мутагенеза, как в случае коммерческого штамма-реципиента *K. phaffii* GS115 [10], либо путем делеции целевого гена с использованием механизма гомологичной рекомбинации. Применение неспецифического мутагенеза часто негативно сказывается на физиологических характеристиках штамма-реципиента, а процесс скрининга целевых мутантов является весьма трудоемким [11]. Использование же механизма гомологичной рекомбинации для получения ауксотрофных штаммов осложняется низкой вероятностью данного события в дрожжах *K. phaffii* [12, 13].

В настоящее время для редактирования генома *K. phaffii* и других организмов успешно применяется система CRISPR/Cas9, основанная на РНК-направляемых ДНК-нуклеазах [14]. Несмотря на ее относительно недавнее появление, эта система уже зарекомендовала себя как точный и высокоэффективный инструмент геномной инженерии. По сравнению с таргетными системами геномного редактирования на основе химерных

нуклеаз, такими как ZNF (Zink Finger Nucleases) и TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nucleases), система CRISPR/Cas9 имеет ряд преимуществ, а также является более эффективной, простой и удобной платформой для прицельного геномного редактирования [15, 16].

Ранее нами был описан прототрофный штамм *K. phaffii* ВКПМ Y-4287 с высоким экспрессионным потенциалом [17] и фитаза *Citrobacter gillenii*, обладающая промышленно-ценными характеристиками [18].

Целью настоящей работы явилась разработка штаммов-реципиентов на основе *K. phaffii* ВКПМ Y-4287 с неизменными ростовыми характеристиками и экспрессионным потенциалом с использованием высокоспецифичной системы CRISPR/Cas9, а также возможность осуществления последовательного введения генетического материала в хромосому реципиента для получения многокопийного штамма-продуцента фитазы *C. gillenii*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы. Триптон, пептон, дрожжевой экстракт, глюкоза, L-лейцин, L-гистидин были получены от компании «Диа-М» (Россия); все ферменты для молекулярных работ — от фирмы «Fermentas» (Литва); фитат натрия («Sigma-Aldrich», США); соли и другие реагенты (все реактивы отечественного производства марки «х.ч.» или «ч.д.а.») — от фирмы «Химмед» (Россия).

Штаммы и среды. Для стандартных генно-инженерных работ (конструирование плазмид, наработка плазмидной ДНК) использовали штамм *E. coli* XL-1 Blue (*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tet^r)*]) ВКПМ В-5667. Культуру растили при 37 °C в среде LB, г/литр: триптон — 10; дрожжевой экстракт — 5; NaCl — 10; если необходимо, добавляли ампициллин или канамицин («Sigma-Aldrich») в концентрации 100 мкг/мл или 50 мкг/мл соответственно.

Штаммы *K. phaffii* GS115 (*his4⁻*) ВКПМ Y-2837 и *K. phaffii* ВКПМ Y-4287 были получены из Биоресурсного Центра Всероссийской Коллекции Промышленных Микроорганизмов (БРЦ ВКПМ). Культуру дрожжей *K. phaffii* растили при 30 °C на среде YPD, г/литр: пептон — 10; дрожжевой экстракт — 10; глюкоза — 20.

Селекцию трансформантов с инактивированным геном *HIS4* или *LEU2* проводили по способности к росту на минимальной среде

без содержания аминокислот YNB («Himedia», Индия) с добавлением и без добавления в среду гистидина или лейцина в концентрации 50 мкг/мл. В качестве источника углерода в среду добавляли глюкозу в количестве 2 мас. %.

Отбор трансформантов, несущих в составе хромосомы ген фитазы из бактерий *C. gillenii*, осуществляли с использованием среды YNB.

Селекцию трансформантов, содержащих автономно реплицирующиеся плазмиды с различными вариантами гидовых РНК (sgРНК), проводили на агаризованной среде YPD с добавлением селективного агента генетицина (G418) («Thermo Scientific», США) в количестве 600 мкг/мл.

Все плотные среды содержали агар в концентрации 20 г/литр.

Конструирование sgРНК. Дизайн sgРНК, состоящих из последовательностей, кодирующих рибозим Hammerhead (НН), транс-активирующей РНК (tracrРНК), рибозим Hepatitis Delta Virus (HDV) и вариабельных спейсерных последовательностей, осуществляли как описано в работе Gao и Zhao [19]. Последовательности НН, tracrРНК и HDV приведены в работе Gao и Zhao [19]. Подбор спейсерных последовательностей и мотивов, расположенных рядом с протоспейсерами (РАМ), осуществляли с использованием онлайн-инструмента E-CRISPR [20]. Чтобы исключить внесение возможных нецелевых мутаций («off-target-эффектов»), проводили гомологичное выравнивание подобранных нуклеотидных последовательностей спейсеров с геномом *Pichia pastoris* (*K. phaffii*) CBS7435 с использованием программы BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). В случае если последовательность спейсера встречалась в геноме более одного раза (при 100% гомологии с целевым локусом), она не использовалась.

Для исследования были выбраны по 3 спейсерные последовательности для нацеливания sgРНК на гены *HIS4* и *LEU2* (табл. 1).

Фрагменты ДНК, кодирующие sgРНК, были синтезированы в компании «Евроген» (Россия). На 5'- и 3'-концах нуклеотидных последовательностей были предусмотрены сайты рестрикции *BpiI*.

Конструирование плазмид с sgРНК, и получение ауксотрофных штаммов *K. phaffii* ВКПМ Y-5013 и *K. phaffii* ВКПМ Y-5014. Автономно реплицирующиеся экспрессионные плазмиды с sgРНК для инактивации генов *HIS4* и *LEU2* конструировали на основе экспрессионного вектора BB3cK_pGAP_23*_pTEF_Cas9 («Addgene», США) [21]. Фрагменты ДНК, кодирующие sgРНК, клонировали в вектор BB3cK_pGAP_23*_pTEF_Cas9 по сайтам *BpiI*.

В результате были получены следующие плазмиды:

pGAP-sgRNA1_his4-pTEF-Cas9-Km,
pGAP-sgRNA2_his4-pTEF-Cas9-Km,
pGAP-sgRNA3_his4-pTEF-Cas9-Km — для инактивации гена *HIS4* и

pGAP-sgRNA1_leu2-pTEF-Cas9-Km,
pGAP-sgRNA2_leu2-pTEF-Cas9-Km,
pGAP-sgRNA3_leu2-pTEF-Cas9-Km — для инактивации гена *LEU2*. Корректность плазмид была подтверждена с помощью рестрикционного анализа и секвенированием (данные не приведены).

Плазмиды трансформировали в штамм *K. phaffii* ВКПМ Y-4287 методом электропорации, как описано ранее [22]. Селекцию трансформантов проводили на агаризованной среде YPD с добавлением генетицина в течение 3-х суток при температуре 30 °С. Для инактивации генов *HIS4* и *LEU2* отобранные трансформанты пересекали 2 раза на среде YPD с добавлением генетицина.

Таблица 1. Нуклеотидный состав спейсерных и РАМ-последовательностей

	sgРНК	Спейсерные последовательности (5'→3')	РАМ-последовательности (5'→3')
<i>HIS4</i>	sgРНК1_his4 (1074–1093 п.н.)	GTACGGTGTGACGTTGGACG	AGG
	sgРНК2_his4 (1591–1610 п.н.)	GTTGGCCTCTATATTCCTGG	TGG
	sgРНК3_his4 (1690–1709 п.н.)	GCACTCTCCACCTAAGAAGGA	TGG
<i>LEU2</i>	sgРНК1_leu2 (430–449 п.н.)	GTTGTTTCGTGAGCTTGTAGG	CGG
	sgРНК2_leu2 (283–302 п.н.)	GGTGATGTCAGACCAGAACA	AGG
	sgРНК3_leu2 (872–891 п.н.)	GCAAGGCTCGTACAGTCCAA	AGG

Селекцию трансформантов с инактивированным геном *HIS4* или *LEU2* проводили по способности к росту на среде YNB с добавлением и без добавления в среду гистидина или лейцина в концентрации 50 мкг/мл. Отбирали штаммы, являющиеся ауксотрофными по гистидину или лейцину.

Выщепление автономно реплицирующихся плазмид из дрожжевых клеток проводили путем культивирования штаммов в жидкой питательной среде YPD при 30 °C и 250 об./мин в течение 48 ч. Далее клетки высевали на агаризованную среду YPD и инкубировали в течение 48 ч при 30 °C. Полученные колонии реплицировали на чашки со средой YPD с добавлением и без добавления генетического фактора. Отбирали клоны, не способные к росту на среде с генетическим фактором.

Эффективность инактивации генов *HIS4* и *LEU2* с использованием различных sgРНК определяли по отношению количества трансформантов, не способных к росту на среде YNB без добавления в среду гистидина или лейцина, к общему количеству трансформантов.

Был получен штамм *K. phaffii* ВКПМ Y-5013, ауксотрофный по гистидину, и штамм *K. phaffii* ВКПМ Y-5014, ауксотрофный по лейцину.

Секвенирование области гена *HIS4* в штамме *K. phaffii* ВКПМ Y-5013 и гена *LEU2* в штамме *K. phaffii* ВКПМ Y-5014 осуществляли с использованием праймеров His-F и His-R (для фрагмента гена *HIS4*), LEU2-F и LEU2-R1 (для фрагмента гена *LEU2*). Последовательности праймеров представлены в табл. 2.

Конструирование экспрессионной интегративной плазмиды pAOX-PhyCg-op-LEU2. Для конструирования плазмиды pAOX-PhyCg-op-LEU2 использовали полученную ранее плазмиду pPIC9-PhyCg-op [18], содержащую в своем составе ген *phyCg-op*, кодирующий фитазу *C. gillenbergii*, встроенный в единую рамку считывания с нуклеотидной последовательностью сигнального пептида α -фактора *Saccharomyces cerevisiae*, под контролем индуцибельного промотора AOX1, терминатор транскрипции TTAOX1 и дрожжевой селективный маркер PpHIS4. В плазмиде pPIC9-PhyCg-op селективный маркер PpHIS4 заменяли на селективный маркер PpLEU2, комплементирующий у дрожжей *K. phaffii* мутацию в гене *LEU2*. Ген *LEU2* с его регуляторной областью синтезировали методом ПЦР, используя в качестве матрицы геномную ДНК дрожжей *K. phaffii* ВКПМ Y-4287 и специфические праймеры LEU2-F и LEU2-R (табл. 2). На 5'- и 3'-концах

Таблица 2. Праймеры и зонды, использованные в работе

Название	Последовательность (5'→3')
LEU2-F	gattgtagtttacctctgccca
LEU2-R	ctagttttttcaaaatg
PhyCg-op-F	gacgaacaatctggtatgcaatt
PhyCg-op-R	ttacttttcagcacattcgcct
His-F	ttaaataagtcctcagtttc
His-R	acttattttattttgcattag
LEU2-R1	ctttcaatggggagagcct
GAPref-F	tttcagagctgacatcaaggt
GAPref-R	cttgtaagccttggtggtagagt
GAP-X	(ROX)-atcaacgacccattcattgctccaga-(BHQ2)
PHYref-F	ccaaagaactagaagactgg
PHYref-R	tgggtcagacttagacttgt
PHY-X	(FAM)-tggtttggctccaaagtgttaaggt-(RTQ1)

нуклеотидной последовательности были предусмотрены сайты рестрикции *PaeI* и *NheI* для клонирования в вектор pPIC9-PhyCg-op.

В результате была получена экспрессионная плаزمида pAOX-PhyCg-op-LEU2. Рестрикционный анализ и секвенирование показали, что плазмиды сконструированы корректно (данные не приведены).

Выделение геномной ДНК проводили с использованием комплекта реагентов для экспресс-выделения ДНК «ДНК-экспресс» («Синтол», Россия). Выделение и очистку ПЦР-продуктов проводили с использованием набора GeneJET Gel Extraction Kit #K0692 («Thermo Scientific»). Все стандартные генно-инженерные манипуляции (обработка ДНК ферментами, лигирование, трансформация клеток *E. coli*) проводили в соответствии со сборником методик [23].

Получение трансформантов штаммов *K. phaffii* ВКПМ Y-5013 и *K. phaffii* ВКПМ Y-5014, продуцирующих фитазу *C. gillenbergii*. Плазмиды pPIC9-PhyCg-op и pAOX-PhyCg-op-LEU2 лианеризовали эндонуклеазой рестрикции BglII, получали экспрессионные кассеты pCIT-His и pCIT-Leu, которые трансформировали в

клетки штаммов *K. phaffii* ВКПМ Y-5013 и *K. phaffii* ВКПМ Y-5014 методом электропорации, как описано ранее [22]. Трансформанты отбирали по способности расти на среде YNB без добавления гистидина или лейцина.

Наличие интегративной кассеты в составе хромосомы трансформантов штаммов *K. phaffii* ВКПМ Y-5013 и *K. phaffii* ВКПМ Y-5014 определяли методом ПЦР с использованием праймеров PhyCg-op-F и PhyCg-op-R (табл. 2).

Условия ферментации дрожжевых штаммов. Трансформанты культивировали следующим образом. Посевную культуру (инокулят) получали выращиванием трансформантов в течение 24 ч при 30 °C и 250 об./мин в жидкой питательной среде YPD. Затем ауксотрофные штаммы засеивали инокулятом в соотношении 1/10 в среду YPD, а восстановившие прототрофность трансформанты засеивали инокулятом в том же соотношении в среду YNB и выращивали при 30 °C в течение 24 ч при 250 об./мин. Далее проводили культивирование в течение 48 ч, добавляя метанол в количестве 1% от объема культуральной жидкости (КЖ) каждые 24 ч. После ферментации отбирали аликвоту, КЖ центрифугировали при 14 000 g в течение 5 мин на центрифуге MiniSpin («Eppendorf», Германия) и проводили анализ супернатанта на наличие фитазной активности.

Определение фитазной активности проводили с помощью модифицированного метода Фиске–Субарроу [24], как описано в работе Tkachenko et al. [18].

При исследовании ростовых характеристик ночные культуры исследуемых штаммов инокулировали с начальным поглощением A_{600} 0,1 в жидкую среду YPD и растили в течение 24 ч. Поглощение КЖ измеряли на спектрофотометре VersaMax Microplate Reader («Molecular Devices», США). Все измерения проводили в трех независимых повторях.

Последовательное введение экспрессионной кассеты в хромосому штамма *K. phaffii* ВКПМ Y-5013. В ауксотрофный штамм методом электропорации трансформировали экспрессионную кассету pCIT-His. Трансформанты отбирали по способности расти на среде YNB без добавления гистидина. Ферментацию отобранных трансформантов проводили, как описано выше. После ферментации клетки осаждали центрифугированием, супернатанты анализировали на наличие фитазной активности. По результатам ферментации отбирали наиболее продуктивный трансформант *K. phaffii* Y-5013/PHF1.

Инактивацию гена *HIS4* в штамме *K. phaffii* Y-5013/PHF1 осуществляли, как описано выше. Полученные ауксотрофные трансформанты культивировали, измеряли фитазную активность в КЖ и отбирали трансформант, в котором не произошло изменение уровня продукции фермента по сравнению с родительским штаммом *K. phaffii* Y-5013/PHF1.

В клетки штамма Y-5013/PHF1 Δ his4 повторно трансформировали экспрессионную кассету pCIT-His и отбирали трансформанты на среде YNB без добавления гистидина. Ферментацию отобранных трансформантов проводили, как описано выше, оценивали уровень продукции фитазы и отбирали наиболее продуктивный трансформант. Таким образом, был получен многокопийный безмаркерный штамм *K. phaffii* Y-5013/PHF2X.

Определение относительного числа копий гена *phyCg-op*. Относительное количество копий гена *phyCg-op*, кодирующего фитазу *C. gillenbergii*, в геномах дрожжевых штаммов определяли при помощи ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) на приборе АНК-32 (Институт аналитического приборостроения РАН, Москва) методом Δ Ct [25]. Рассчитывали разницу между значениями Ct референсного гена *GAP*, представленного в геноме в одной копии [26], и исследуемого гена. Для референсного гена были синтезированы праймеры GAPref-F, GAPref-R и зонд GAP-X, меченный флуорофором ROX и гасителем флуоресценции BHQ-2; для гена *phyCg-op* – PHYref-F, PHYref-R, а также зонд PHY-X, меченный флуорофором FAM и гасителем флуоресценции RTQ-1. Последовательности праймеров приведены в табл. 2. Для проведения ПЦР-РВ использовали набор реактивов ПЦР-Микс («Синтол»). В реакционную смесь вносили по 5 пМ каждого праймера и зонда, 2 мкл матрицы; общий объем реакционной смеси доводили до 25 мкл ddH₂O. В качестве матрицы использовали хромосомную ДНК штаммов *K. phaffii* Y-5013/PHF1 и *K. phaffii* Y-5013/PHF2X. ПЦР-РВ проводили по следующей программе: первоначальное плавление цепей ДНК при 95 °C в течение 300 с; далее 37 циклов: 95 °C – 15 с, 60 °C – 40 с. ПЦР проводили в трех независимых повторях. Относительное количество продукта, образовавшегося в процессе ПЦР, рассчитывали по формуле: $P \sim (1 + E)^n$, где P – относительное количество продукта, E – средняя эффективность цикла, n – число циклов. Специфичность ампликонов была подтверждена путем анализа кривой плавления после 30 циклов и электрофореза в агарозном геле.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение ауксотрофных штаммов *K. phaffii* ВКПМ Y-5013 и *K. phaffii* ВКПМ Y-5014. Ауксотрофные штаммы получали путем инактивации гена *HIS4* или гена *LEU2* в хромосоме штамма *K. phaffii* Y-4287 с помощью системы CRISPR/Cas9.

Для успешного геномного редактирования исследуемого штамма и исключения нецелевых мутаций необходим рациональный дизайн sgРНК. Кроме того, эффективная sgРНК должна одновременно демонстрировать наивысшую целевую эффективность и наименьшую нецелевую активность. Поскольку фактическая эффективность sgРНК может различаться, для исследования были разработаны по 3 варианта sgРНК с различными спейсерными последовательностями, нацеленные на разные участки генов *HIS4* и *LEU2*. Содержание GC-пар в спейсерных последовательностях составляло 50–60%, так как в работе Wong et al. [27] было показано, что высокое и низкое содержание GC-пар в спейсерной последовательности характерно для нефункциональных sgРНК. Последовательности спейсеров приведены в табл. 1.

Преимуществом нацеливания sgРНК на последовательности генов, кодирующих ферменты биосинтеза аминокислот, является простое и надежное подтверждение инактивации этих генов, основанное на способности полученных штаммов к росту на минимальной среде.

Для инактивации генов *HIS4* и *LEU2* были сконструированы автономно реплицирующиеся плазмиды pGAP-sgRNA1_his4-pTEF-Cas9-Km,

pGAP-sgRNA2_his4-pTEF-Cas9-Km, pGAP-sgRNA3_his4-pTEF-Cas9-Km, pGAP-sgRNA1_leu2-pTEF-Cas9-Km, pGAP-sgRNA2_leu2-pTEF-Cas9-Km и pGAP-sgRNA3_leu2-pTEF-Cas9-Km, содержащие различные варианты sgРНК под контролем GAP-промотора, а также оптимизированную последовательность гена *cas9* из *Streptococcus pyogenes*, встроенную в единую рамку считывания с нуклеотидной последовательностью сигнала ядерной локализации большого Т-антигена SV40, под контролем дрожжевого TEF-промотора и CYC1-терминатора.

Плазмиды трансформировали в штамм *K. phaffii* ВКПМ Y-4287. Для определения эффективности инактивации генов *HIS4* и *LEU2* было проанализировано по 100 трансформантов, полученных с использованием каждого варианта sgРНК (рис. 1).

Исследования показали, что эффективность инактивации целевых генов различалась в зависимости от используемой конструкции. Так, эффективность инактивации гена *HIS4* с использованием различных sgРНК составила 65–98%. Самыми эффективными оказались sgРНК1_his4 и sgРНК2_his4, показав сравнительно одинаковую эффективность (97% – для sgРНК1_his4 и 98% – для sgРНК2_his4).

Эффективность инактивации гена *LEU2* составила 15–72%. Самую низкую эффективность инактивации показала sgРНК1_leu2 (15%), а самой эффективной оказалась sgРНК2_leu2 с эффективностью 72%.

Известно, что эффективность системы CRISPR/Cas9 зависит от нуклеотидного состава спейсерных последовательностей sgРНК и PAM-сайта [28]. Так, в работе Yang et al. [29]

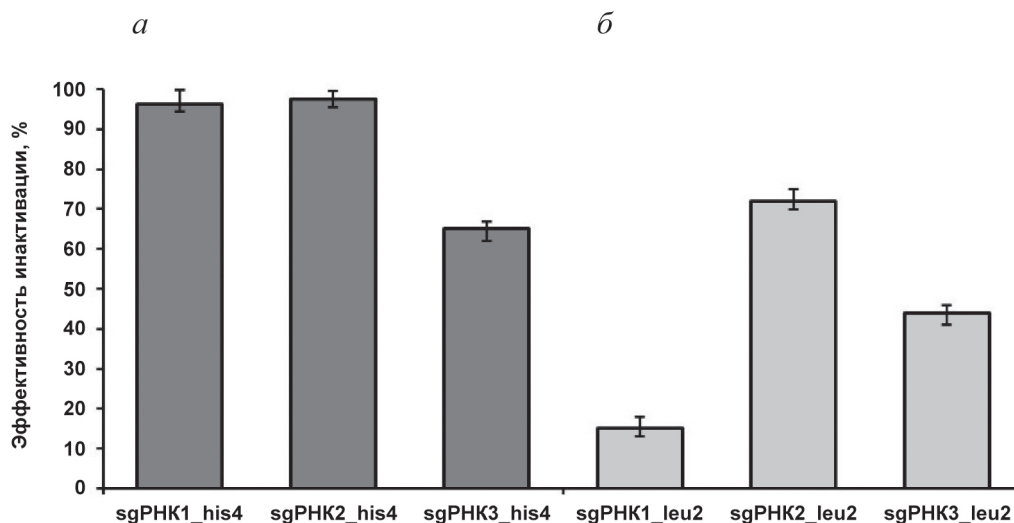


Рис. 1. Эффективность инактивации генов *HIS4* и *LEU2* с использованием различных вариантов sgРНК. *a* – Инактивация гена *HIS4*; *б* – инактивация гена *LEU2*. Приведены средние значения и стандартные отклонения

утверждалось, что предпочтительным РАМ-сайтом, примыкающим к спейсеру sgРНК, является CGG, однако в нашей работе высокую эффективность инактивации показали sgРНК, для которых сайтами РАМ были AGG и TGG. Опираясь на результаты исследований в работе Doench et al. [30], это можно, предположительно, объяснить различным нуклеотидным составом РАМ-проксимальных областей спейсеров sgРНК.

Для дальнейшей работы были отображены штаммы *K. phaffii* TGBF7 (фенотип His⁻, получен с использованием sgРНК3_his4) и *K. phaffii* YLM9 (фенотип Leu⁻, получен с использованием sgРНК2_leu2), не способные к росту на среде YNB без добавления гистидина или лейцина. Выщепление автономно реплицирующихся плазмид проводили путем двукратных пересевов на среде YPD без селективного давления.

Для подтверждения инактивации гена *HIS4* в штамме *K. phaffii* TGBF7 и гена *LEU2* в штамме *K. phaffii* YLM9 было проведено секвенирование областей, в которых при воздействии нуклеазы Cas9 должны были произойти мутации. Результаты секвенирования представлены на рис. 2.

В результате действия комплекса sgРНК3_his4-Cas9 в последовательности гена *HIS4* произошла делеция размером 1 п.н. на расстоянии 3 п.н. от сайта РАМ, а в результате действия комплекса sgРНК2_leu2-Cas9 в последовательности гена *LEU2* произошла делеция размером 1 п.н. на расстоянии 4 п.н. от сайта РАМ. Полученные результаты объясняются тем, что у дрожжей *K. phaffii* двухцепочечные разрывы геномной ДНК, вносимые нуклеазой Cas9, восстанавливаются в основном клеточным механизмом негомологичного соединения концов, в результате чего в месте разрыва, как правило, происходят делеции или вставки нуклеотидов, что приводит к сдвигу рамки считывания кодирующей последовательности [31].

Сдвиг рамок считывания и образование преждевременных стоп-кодонов в последовательностях генов *HIS4* и *LEU2* привело к невозможности синтеза гистидиндегидрогеназы и β-изопротилмалатдегидрогеназы, участвующих в биосинтезе гистидина и лейцина, в результате чего штаммы приобрели ауксотрофность по этим аминокислотам.

Ауксотрофные штаммы *K. phaffii* TGBF7 и *K. phaffii* YLM9 были депонированы в БРЦ ВКПМ под номерами ВКПМ Y-5013 и ВКПМ Y-5014 соответственно [32, 33].

Изучение ростовых характеристик штаммов *K. phaffii* ВКПМ Y-5013 и *K. phaffii*

а



б



Рис. 2. Результаты секвенирования фрагментов гена *HIS4* штамма *K. phaffii* TGBF7 (а) и гена *LEU2* штамма *K. phaffii* YLM9 (б). Последовательности ДНК-мишеней выделены серым цветом, сайты РАМ — подчеркиванием

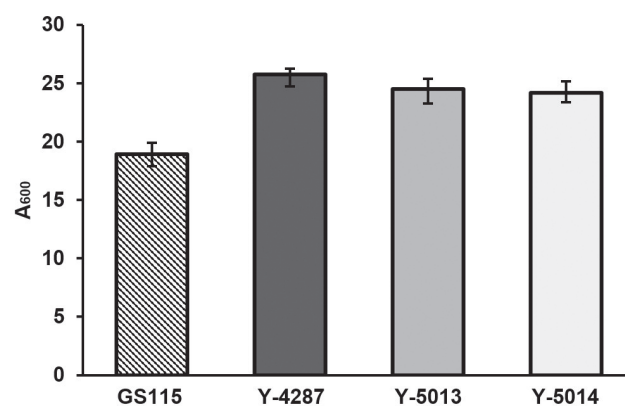


Рис. 3. Накопление биомассы штаммами за 24 ч при 30 °С

ВКПМ Y-5014. Ростовые характеристики штаммов *K. phaffii* ВКПМ Y-5013 и *K. phaffii* ВКПМ Y-5014 изучались в сравнении с характеристиками родительского штамма *K. phaffii* Y-4287 и коммерческого штамма *K. phaffii* GS115 Y-2837. Было проведено сравнение уровня накопления биомассы за 24 ч в среде YPD путем измерения поглощения КЖ исследуемых штаммов. Результаты измерений представлены на рис. 3.

Исследования показали, что количество накопленной биомассы штаммами *K. phaffii* ВКПМ Y-5013 и *K. phaffii* ВКПМ Y-5014 превышало таковое для контрольного штамма *K. phaffii* GS115 Y-2837 более чем на 20%. Также наблюдалось незначительное снижение накопленной биомассы ауксотрофных штаммов относительно штамма дикого типа *K. phaffii* Y-4287.

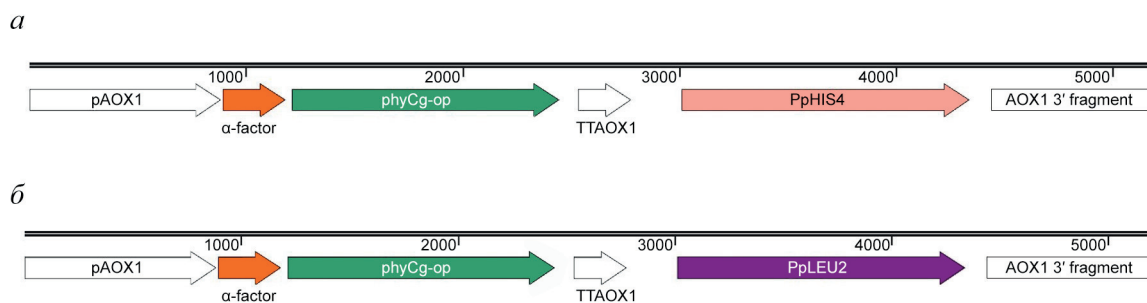


Рис. 4. Строение интегративных экспрессионных кассет. а – Кассета pCIT-His; б – кассета pCIT-Leu

Широко известно, что система CRISPR/Cas9 обеспечивает высокоэффективное редактирование генома у широкого спектра организмов [34], однако, несмотря на свою высокую специфичность, может проявлять нецелевую активность [35], что может негативно сказываться на их физиологических характеристиках. Несущественное изменение ростовых характеристик штаммов *K. phaffii* ВКПМ Y-5013 и *K. phaffii* ВКПМ Y-5014 относительно родительского штамма *K. phaffii* Y-4287 свидетельствует о высокой специфичности и низкой нецелевой активности разработанных sgРНК, с использованием которых были получены ауксотрофные штаммы.

Изучение экспрессионного потенциала штаммов-реципиентов. Экспрессионный потенциал штаммов *K. phaffii* ВКПМ Y-5013 и *K. phaffii* ВКПМ Y-5014 изучали по продуктивности получаемых на их основе трансформантов, секретирующих фитазу *C. gillenii*. Ранее было показано, что ген *phyCg-op*, кодирующий данную фитазу, эффективно экспрессируется в дрожжах *K. phaffii* [18].

Плазмиды pPIC9-PhyCg-op и pAOX-PhyCg-op-LEU2 лианеризовали эндонуклеазой рестрикции BglII, и получали экспрессионные кассеты pCIT-His (рис. 4, а) и pCIT-Leu (рис. 4, б), которые были трансформированы в клетки штаммов *K. phaffii* ВКПМ Y-5013 и *K. phaffii* ВКПМ Y-5014.

Таблица 3. Средняя продуктивность трансформантов ауксотрофных штаммов

Штамм	Средняя продуктивность трансформантов, ед./мл	Относительная продуктивность трансформантов, %
Y-2837	126,2 ± 3,1	100
Y-5013	265,4 ± 1,9	210
Y-5014	253,6 ± 2,6	201

В качестве контроля получали трансформанты штамма *K. phaffii* GS115 ВКПМ Y-2837. Затем случайным образом отбирали по 10 ПЦР-положительных трансформантов каждого штамма и проводили их ферментацию. После ферментации измеряли фитазную активность трансформантов в КЖ.

На основании полученных данных определяли среднюю продуктивность трансформантов исследуемых штаммов. Результаты сравнения этих величин со средней продуктивностью трансформантов контрольного штамма *K. phaffii* GS115 ВКПМ Y-2837, принятой за 100%, приведены в табл. 3.

Из данных, приведенных в табл. 3, следует, что среднее значение продуктивности трансформантов штаммов *K. phaffii* ВКПМ Y-5013 и *K. phaffii* ВКПМ Y-5014 превышает таковое для трансформантов коммерческого штамма *K. phaffii* GS115 ВКПМ Y-2837 более чем в 2,1 и 2,0 раза соответственно. Таким образом, было показано, что полученные штаммы-реципиенты обладают высоким экспрессионным потенциалом, что позволяет использовать их для получения высокопродуктивных штаммов-продуцентов гетерологичных белков.

По результатам ферментации был отобран наиболее продуктивный штамм *K. phaffii* Y-5013/PHF1, секретирующий фитазу *C. gillenii* в количестве 286 ед./мл. Определение количества копий гена *phyCg-op* в хромосоме отобранного штамма проводили методом ПЦР-РВ. Было выявлено наличие 2-х копий гена, кодирующего фитазу *C. gillenii*.

Повторная интеграция экспрессионной кассеты pCIT-His. Количество копий целевого гена является важным фактором для продукции целевого белка в дрожжах *K. phaffii* [36]. Введение в состав хромосомы штаммов-реципиентов множественных копий целевых генов является одним из подходов к получению высокоактивных штаммов-продуцентов гетерологичных белков. В связи с этим был предложен способ последовательной интеграции генетического материала в геном дрожжей

K. phaffii с использованием системы CRISPR/Cas9.

В штамме *K. phaffii* Y-5013/PHF1 была проведена инактивация маркерного гена *HIS4*. Для этого в клетки штамма трансформировали плазмиду pGAP-sgRNA3_his4-pTEF-Cas9-Km, получали трансформанты и проводили их селекцию на предмет приобретения ауксотрофности по гистидину, как описано выше. Проверка продуктивности 10 случайно отобранных ауксотрофных трансформантов показала отсутствие влияния введенной мутации на продукцию фитазы. Был выбран штамм Y-5013/PHF1 Δ his4, в который повторно трансформировали экспрессионную кассету pCIT-His. Продуктивность трансформантов определяли путем измерения фитазной активности в КЖ. В результате был отобран наиболее продуктивный штамм *K. phaffii* Y-5013/PHF2X, секретирующий фитазу *C. gillenii* в количестве 480,5 ед./мл. Штамм был депонирован в БРЦ ВКПМ под номером ВКПМ Y-5127. Методом ПЦР-РВ было определено, что в хромосоме штамма *K. phaffii* ВКПМ Y-5127 содержится 5 копий гена *phyCg-op*. Таким образом, была показана возможность последовательной интеграции генетического материала в хромосому штамма-реципиента с использованием системы CRISPR/Cas9.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С использованием системы геномного редактирования CRISPR/Cas9 были скон-

струированы ауксотрофные штаммы-реципиенты *K. phaffii* ВКПМ Y-5013 (фенотип His⁻) и *K. phaffii* ВКПМ Y-5014 (фенотип Leu⁻), обладающие ростовыми характеристиками, сравнимыми с родительским штаммом, и высоким экспрессионным потенциалом, что было продемонстрировано на примере экспрессии гена фитазы *C. gillenii*.

Был продемонстрирован способ последовательной интеграции генетического материала в хромосому дрожжей *K. phaffii* с использованием системы CRISPR/Cas9. Применение данного способа позволило получить многокопийный безмаркерный штамм-продуцент фитазы *C. gillenii* с активностью 480,5 ед./мл КЖ.

Вклад авторов. Т.Л. Гордеева, С.П. Синевский — концепция и руководство работой; А.А. Ткаченко — проведение экспериментов; Т.Л. Гордеева, А.А. Ткаченко, Л.Н. Борщевская — обсуждение результатов исследования; А.А. Ткаченко, Т.Л. Гордеева — написание текста; Т.Л. Гордеева, Л.Н. Борщевская, А.А. Ткаченко — редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации: грант для Курчатовского центра геномных исследований (Соглашение № 075-15-2019-1659).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ahmad, M., Hirz, M., Pichler, H., and Schwab, H. (2014) Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **98**, 5301-5317, doi: 10.1007/s00253-014-5732-5.
2. Luo, H. Y., Yao, B., Yuan, T. Z., Wang, Y. R., Shi, X. Y., Wu, N. F., and Fan, Y. L. (2004) Overexpression of *Escherichia coli* phytase with high specific activity, *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao=Chin. J. Biotechnol.*, **20**, 78-84.
3. Huang, H., Luo, H., Yang, P., Meng, K., Wang, Y., Yuan, T., Bai, Y., and Yao, B. (2006) A novel phytase with preferable characteristics from *Yersinia intermedia*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **350**, 884-889, doi: 10.1016/j.bbrc.2006.09.118.
4. Xiong, A. S., Yao, Q. H., Peng, R. H., Zhang, Z., Xu, F., Liu, J. G., Han, P. L., and Chen, J. M. (2006) High level expression of a synthetic gene encoding *Peniophora lycii* phytase in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*, *App. Microbiol. Biotechnol.*, **72**, 1039-1047, doi: 10.1007/s00253-006-0384-8.
5. Pal Roy, M., Mazumdar, D., Dutta, S., Saha, S. P., and Ghosh, S. (2016) Cloning and expression of phytase *appA* gene from *Shigella* sp. CD2 in *Pichia pastoris* and comparison of properties with recombinant enzyme expressed in *E. coli*, *PLoS One*, **11**, e0145745, doi: 10.1371/journal.pone.0145745.
6. Zhao, W., Xiong, A., Fu, X., Gao, F., Tian, Y., and Peng, R. (2010) High level expression of an acid-stable phytase from *Citrobacter freundii* in *Pichia pastoris*, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **162**, 2157-2165, doi: 10.1007/s12010-010-8990-4.
7. Розанов А. С., Першина Е. Г., Богачева Н. В., Шляхтун В., Сычев А. А., Пельтек С. Е. (2020)

- Разнообразие и распространение метилотрофных дрожжей, используемых в генной инженерии, *Вавиловский журнал генетики и селекции*, **24**, 149-157, doi: 10.18699/VJ20.602.
8. Pronk, J. T. (2002) Auxotrophic yeast strains in fundamental and applied research, *App. Environ. Microbiol.*, **68**, 2095-2100, doi: 10.1128/AEM.68.5.2095-2100.2002.
 9. Wang, Y., Yau, Y. Y., Perkins-Balding, D., and Thomson, J. G. (2011) Recombinase technology: applications and possibilities, *Plant Cell Rep.*, **30**, 267-285, doi: 10.1007/s00299-010-0938-1.
 10. Cregg, J. M., Barringer, K. J., Hessler, A. Y., and Madden, K. R. (1985) *Pichia pastoris* as a host system for transformations, *Mol. Cell. Biol.*, **5**, 3376-3385, doi: 10.1128/mcb.5.12.3376-3385.1985.
 11. Theodorakis, C. W. (2018) Mutagenesis, in *Encyclopedia Ecology* (S. E. Jørgensen, B. D. Fath, eds.) Academic Press, pp. 2475-2484, doi: 10.1016/b978-008045405-4.00408-0.
 12. Näätäsaari, L., Mistlberger, B., Ruth, C., Hajek, T., Hartner, F. S., and Glieder, A. (2012) Deletion of the *Pichia pastoris* KU70 homologue facilitates platform strain generation for gene expression and synthetic biology, *PLoS One*, **7**, e39720, doi: 10.1371/journal.pone.0039720.
 13. Weninger, A., Fischer, J. E., Raschmanova, H., Vogl, T., and Glieder, A. (2018) Expanding the CRISPR/Cas9 toolkit for *Pichia pastoris* with efficient donor integration and alternative resistance markers, *J. Cell. Biochem.*, **119**, 3183-3198, doi: 10.1002/jcb.26474.
 14. Weninger A., Hatzl A. M., Schmid C., Vogl, T., and Glieder, A. (2016) Combinatorial optimization of CRISPR/Cas9 expression enables precision genome engineering in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*, *J. Biotechnol.*, **235**, 139-149, doi: 10.1016/j.jbiotec.2016.03.027.
 15. Немудрый А. А., Валетдинова К. Р., Медведев С. П., Закиян С. М. (2014) Системы редактирования геномов TALEN и CRISPR/Cas инструменты открытий, *Acta Naturae*, **6**, 20-42, doi: 10.32607/20758251-2014-6-3-19-40.
 16. Mohammadhassan, R., Tutunchi, S., Nasehi, N., Goudarziasl, F., and Mahya, L. (2023) The prominent characteristics of the effective sgRNA for a precise CRISPR genome editing, *CRISPR Technol. Recent Adv.*, IntechOpen, doi: 10.5772/intechopen.106711.
 17. Гордеева Т. Л., Борщевская Л. Н., Федай Т. В., Ткаченко А. А., Синеокий С. П. (2021) Изучение экспрессионного потенциала новых штаммов дрожжей рода *Komagataella*, *Биотехнология*, **37**, 5-13, doi: 10.21519/0234-2758-2021-37-4-5-13.
 18. Tkachenko, A. A., Kalinina, A. N., Borshchevskaya, L. N., Sineoky, S. P., and Gordееva, T. L. (2021) A novel phytase from *Citrobacter gillenii*: characterization and expression in *Pichia pastoris* (*Komagataella pastoris*), *FEMS Microbiol. Lett.*, **368**, fnaa217, doi: 10.1093/femsle/fnaa217.
 19. Gao, Y., and Zhao, Y. (2014) Self-processing of ribozyme-flanked RNAs into guide RNAs *in vitro* and *in vivo* for CRISPR-mediated genome editing, *J. Integr. Plant. Biol.*, **56**, 343-349, doi: 10.1111/jipb.12152.
 20. Heigwer, F., Kerr, G., and Boutros, M. (2014) E-CRISP: fast CRISPR target site identification, *Nat. Methods*, **11**, 122-123, doi: 10.1038/nmeth.2812.
 21. Gassler, T., Heisteringer, L., Mattanovich, D., Gasser, B., and Prielhofer, R. (2019) CRISPR/Cas9-mediated homology-directed genome editing in *Pichia pastoris*, *Recombinant protein production in yeast, Methods in Molecular Biology*, Humana Press, N.Y., pp. 211-225, doi: 10.1007/978-1-4939-9024-5_9.
 22. Gasser, B., Prielhofer, R., Marx, H., Maurer, M., Nocon, J., Steiger, M., Puxbaum, V., Sauer, M., and Mattanovich, D. (2013) *Pichia pastoris*: protein production host and model organism for biomedical research, *Fut. Microbiol.*, **8**, 191-208, doi: 10.2217/fmb.12.133.
 23. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edn.*, Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.
 24. Chen, C. C., Wu, P. H., Huang, C. T., and Cheng, K. (2004) A *Pichia pastoris* fermentation strategy for enhancing the heterologous expression of an *Escherichia coli* phytase, *Enzyme Microb. Technol.*, **35**, 315-320, doi: 10.1016/j.enzmtec.2004.05.007.
 25. Ребриков Д. В. (2011) *ПЦР в реальном времени*, БИНОМ, Москва.
 26. Waterham, H. R., Digan, M. E., Koutz, P. J., Lair, S. V., and Cregg, J. M. (1997) Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter, *Gene*, **186**, 37-44, doi: 10.1016/S0378-1119(96)00675-0.
 27. Wong, N., Liu, W., and Wang, X. (2015) WU-CRISPR: characteristics of functional guide RNAs for the CRISPR/Cas9 system, *Genome Biol.*, **16**, 218, doi: 10.1186/s13059-015-0784-0.
 28. Cho, S. W., Kim, S., Kim, Y., Kweon, J., Kim, H. S., Bae, S., and Kim, J. S. (2014) Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases, *Genome Res.*, **24**, 132-141, doi: 10.1101/gr.162339.113.
 29. Yang, Y., Liu, G., Chen, X., Liu, M., Zhan, C., Liu, X., and Bai, Z. (2020) High efficiency CRISPR/Cas9 genome editing system with an eliminable episomal sgRNA plasmid in *Pichia pastoris*, *Enzyme Microb. Technol.*, **138**, 109556, doi: 10.1016/j.enzmtec.2020.109556.
 30. Doench, J. G., Hartenian, E., Graham, D. B., Tothova, Z., Hegde, M., Smith, I., Sullender, M., Ebert, B. L., Xavier, R. J., and Root, D. E. (2014)

- Rational design of highly active sgRNAs for CRISPR-Cas9-mediated gene inactivation, *Nat. Biotechnol.*, **32**, 1262–1267, doi: 10.1038/nbt.3026.
31. Liu, Q., Shi, X., Song, L., Liu, H., Zhou, X., Wang, Q., Zhang, Y., and Cai, M. (2019) CRISPR–Cas9-mediated genomic multiloci integration in *Pichia pastoris*, *Microb. Cell Factories*, **18**, 144, doi: 10.1186/s12934-019-1194-x.
 32. Патент № 2787584C1 Российская Федерация, МПК C12N1/19, C12N15/81, C12N9/24. Штамм дрожжей *Komagataella phaffii* с инактивированным геном *HIS4* – реципиент для конструирования безмаркерных штаммов-продуцентов гетерологичных белков: №2022127026: заявл. 18.10.2022: опубл. 11.01.2023/Ткаченко А. А., Гордеева Т. Л., Синеокий С. П., Борщевская Л. Н., Федай Т. Д.; заявитель Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”» – 11 с.
 33. Патент № 2788528 Российская Федерация, МПК C12N 1/19, C12N 15/63. Штамм дрожжей *Komagataella phaffii* с инактивированным геном *LEU2* – реципиент для конструирования штаммов-продуцентов гетерологичных белков: № 2022127025: заявл. 18.10.2022: опубл. 23.01.2023/Ткаченко А. А., Гордеева Т. Л., Синеокий С. П., Борщевская Л. Н.; заявитель Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”» – 13 с.
 34. Hsu, P. D., Lander, E. S., and Zhang, F. (2014) Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering, *Cell*, **157**, 1262–1278, doi: 10.1016/j.cell.2014.05.010.
 35. Zhang, X. H., Tee, L. Y., Wang, X. G., Huang, Q. S., and Yang, S. H. (2015) Off-target effects in CRISPR/Cas9-mediated genome engineering, *Mol. Ther. Nucleic. Acids*, **4**, E264, doi: 10.1038/mtna.2015.37.
 36. Zhu, T., Guo, M., Tang, Z., Zhang, M., Zhuang, Y., Chu, J., and Zhang, S. (2009) Efficient generation of multi-copy strains for optimizing secretory expression of porcine insulin precursor in yeast *Pichia pastoris*, *J. Appl. Microbiol.*, **107**, 954–963, doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04279.x.

CRISPR/Cas9-MEDIATED GENOME EDITING OF THE *Komagataella phaffii* TO OBTAIN A PHYTASE-PRODUCER MARKERLESS STRAIN

A. A. Tkachenko*, L. N. Borshchevskaya, S. P. Sineoky, and T. L. Gordeeva

NRC “Kurchatov Institute”, 117545 Moscow, Russia; e-mail: artur.tka4enko10@gmail.com

Using the CRISPR/Cas9 system, the recipient strains *K. phaffii* VKPM Y-5013 (His[−] phenotype) and *K. phaffii* VKPM Y-5014 (Leu[−] phenotype) were derived from the *K. phaffii* VKPM Y-4287 strain, which has a high expression potential. Based on developed recipients, markerless producers can be obtained. The gene inactivation efficiency with different variants of sgRNA ranged from 65 to 98% and from 15 to 72% for *HIS4* and *LEU2*, respectively. The recipient strains retained the growth characteristics of the parent strain and have a high expression potential, as estimated by the production of heterologous phytase from *Citrobacter gillenii*. The average productivity of the transformants based on *K. phaffii* VKPM Y-5013 and *K. phaffii* VKPM Y-5014 strains was 2.1 and 2.0 times higher than the productivity of the transformants of the commercial *K. phaffii* GS115 strain. Sequential integration of genetic material into the genome of the *K. phaffii* VKPM Y-5013 strain was proposed. A highly effective multicopy markerless strain producing *C. gillenii* phytase was obtained.

Keywords: CRISPR/Cas9, *Komagataella phaffii*, genome editing, phytase, *Citrobacter gillenii*