

© 2022 Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas, 25: 1-21, 2022.

<https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2022.502>

Introducción a los sistemas CRISPR y sus aplicaciones en levaduras

**Benjamín Mendoza-Téllez, Alberto Zamora-Bello,
Miguel Rosas-Paz, Diana Villarreal-Huerta, Ileana de la Fuente,
Claudia Segal-Kischinevzky y James González***

Departamento de Biología Celular, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. Avenida Universidad # 3000, Cd. Universitaria, Alcaldía Coyoacán 04510, Ciudad de México, México. E-mail: *james@ciencias.unam.mx

*“El límite de las aplicaciones derivadas de la edición genética con las herramientas CRISPR está en la imaginación de los investigadores”
Lluís Montoliu, 2019*

RESUMEN

El sistema de inmunidad adaptativa en bacterias y arqueas, encargado de reconocer las secuencias de DNA invasores, se caracteriza por tener grupos de secuencias palindrómicas cortas repetidas e intercaladas de manera regular por espaciadores (CRISPR). Las proteínas asociadas a CRISPR (Cas) y los RNAs guías complementarios a secuencias específicas del DNA blanco constituyen una de las herramientas de edición genética más utilizadas para modificar a los organismos. En los últimos años se ha incrementado la variedad de los sistemas CRISPR/Cas, adaptándose a microorganismos como las levaduras, que cuentan con potencial biotecnológico. El objetivo de esta revisión es facilitar la comprensión de los conceptos básicos del sistema CRISPR/Cas9 y reconocer algunas de las variedades de esta herramienta molecular que se han implementado de manera exitosa en distintas levaduras. Asimismo, se describen varias de las nuevas tecnologías basadas en CRISPR que están revolucionando la investigación.

Palabras clave: CRISPR, Cas9, edición genética, levaduras, ingeniería genética, herramientas moleculares.

Introduction to CRISPR systems and their applications in yeasts

ABSTRACT

The adaptive immunity system in bacteria and archaea, responsible for recognizing invasive DNA sequences, is characterized by clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR). CRISPR-associated proteins (Cas) and guide RNAs complementary to specific target DNA sequences are the most widely used gene-editing tools to modify organisms. Currently, the variety of CRISPR/Cas systems has increased, adapting to microorganisms such as yeasts with biotechnological potential. This review aims to facilitate understanding of the basic concepts of the CRISPR/Cas9 system and to recognize some of the varieties of this molecular tool that have been successfully implemented in different yeasts. Likewise, some of the new technologies that are revolutionizing research based on CRISPR are described.

Key words: CRISPR, Cas9, gene-editing, yeasts, genetic engineering, molecular tools.

INTRODUCCIÓN

Breve historia de las CRISPR y su función como sistema inmune en las bacterias

Los sistemas CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) y sus proteínas Cas (CRISPR Associated Proteins) son un grupo de genes que actúan de manera simultánea para identificar y eliminar las secuencias de DNA invasoras, funcionando como una memoria de infecciones previas en la mayoría de los procariontes (bacterias, ~50%; arqueas, ~87%) (Makarova *et al.*, 2015; Zhang, Wu, Wu, Chang & Liu, 2021). Estas secuencias fueron descritas por primera vez en 1987 por Ishino y colaboradores como una serie de repeticiones interespaciadas de DNA parcialmente palindrómicas (del griego *palin dromein*, refiriéndose a una frase que se lee igual hacia adelante que hacia atrás), en la región 3' río abajo del gen responsable de la conversión de la isoenzima fosfatasa alcalina (*iap*) de *Escherichia coli* (Ishino, Shinagawa, Makino, Amemura & Nakamura, 1987). Posteriormente, otros grupos de investigación reportaron secuencias palindrómicas similares de ~29 nucleótidos espaciadas de manera repetida por otros ~32 nucleótidos en especies de bacterias (*Mycobacterium tuberculosis*) y arqueas (*Haloferax mediterranei*) (Groenen, Bunschoten, Van Soolingen & van Embden, 1993; Mojica, Juez & Rodríguez-Valera, 1993). Los avances en la secuenciación de genomas en los años 90 hicieron posible encontrar más secuencias de otras especies en los siguientes años. Aunque su estructura y función no estaban del todo dilucidadas, fueron utilizadas en la tipificación de bacterias (Barrangou & Horvath, 2017). En este periodo surgieron distintos acrónimos para nombrarlas como: repeticiones variables directas (DVR), repeticiones en tándem (TREP), secuencias repetitivas repetidas en tándem largas (LTRR), repeticiones cortas espaciadas de manera regular (SRSR), grupos grandes de repeticiones en tándem (LCTR) y repeticiones directas intercaladas con espaciador (SPIDR). En 2002, Jansen y colaboradores las nombraron "CRISPR" y se describieron los genes *Cas* (Figura 1) (Mojica, Díez-Villaseñor, García-Martínez & Soria, 2005; Barrangou & Horvath, 2017; Jansen, Van Embden, Gastra & Schouls, 2002). En los siguientes años, se logra entender la función de las múltiples proteínas Cas descubiertas, proponiendo a CRISPR como un sistema de inmunidad adquirida ante los bacteriófagos (Makarova, Grishin, Shabalina, Wolf & Koonin, 2006; Barrangou *et al.*, 2007). Jinek y colaboradores (2012) generan una quimera de RNA que puede unirse a Cas9, sugiriendo una posible aplicación como sistema de edición genética (Jinek *et al.*, 2012). Posteriormente, inicia la revolución CRISPR y su uso se hizo común en bacterias, levaduras, plantas, animales y otros organismos, debido a la rapidez y versatilidad del sistema. En 2020, Jennifer Doudna y Emmanuelle Charpentier de la Universidad de California, Berkeley, recibieron el Premio Nobel de Química por crear y proponer el RNA guía, que marcó el comienzo de la edición genética en todo tipo de células (Ledford & Callaway, 2020). En los siguientes dos años, CRISPR se utilizó para detectar al

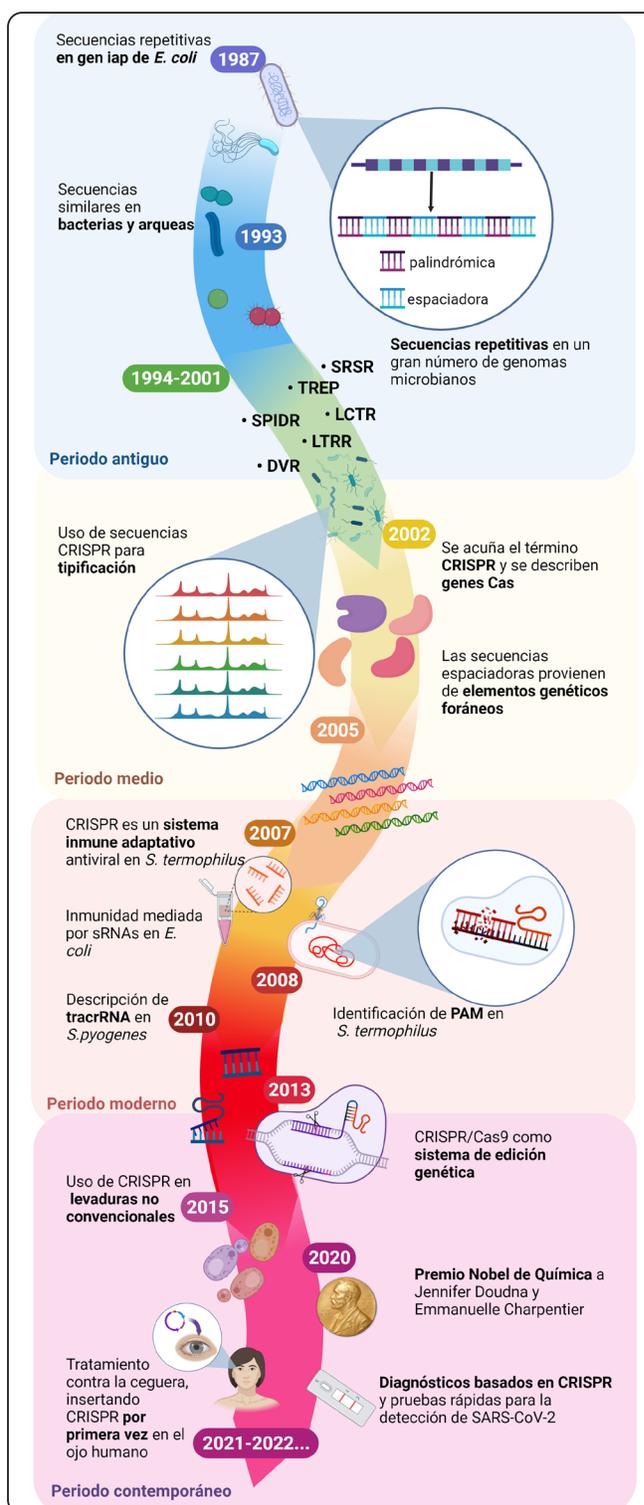


Figura 1. Descubrimientos importantes en las investigaciones del sistema CRISPR/Cas. Los periodos antiguo y medio marcan el descubrimiento y elucidación de las misteriosas secuencias CRISPR (1987-2005). Los periodos (moderno y contemporáneo) ilustran los eventos que desarrollaron la famosa tecnología de edición genética CRISPR y sus aplicaciones más novedosas (2007-2022). Elaboración personal usando BioRender.com.

virus de SARS-CoV-2 mediante pruebas rápidas y lograrlo abatir (de Puig *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2021). Las pruebas portátiles para diagnosticar COVID-19 basadas en CRISPR detectan una amplia gama de objetivos moleculares de importancia médica (Kaminski, Abudayyeh, Gootenberg, Zhang & Collins, 2021). CRISPR también tuvo éxito en intervenciones médicas al insertarlo de manera directa en la retina del ojo humano con el fin de combatir el trastorno de ceguera hereditario (Ledford, 2020). Asimismo, se han obtenido resultados alentadores con CRISPR en la primera terapia celular en humanos para intentar erradicar el cáncer pulmonar (He, 2020), incluyendo estudios exitosos *in vitro* e *in vivo* en animales modelo para tratar diferentes tipos de cáncer (Katti, Diaz, Caragine, Sanjana & Dow, 2022). En 2021, se comenzaron a realizar ensayos clínicos para usar CRISPR en el tratamiento de pacientes con la enfermedad de células falciformes (Eisenstein, 2021; Kaiser, 2021). En los últimos años, se han desarrollado más herramientas basadas en CRISPR con resultados positivos en el tratamiento de enfermedades a nivel mundial, como el cáncer de mieloma refractario avanzado, el sarcoma metastásico (Stadtmauer *et al.*, 2020), y la fibrosis quística (Geurts *et al.*, 2020). Además, la tecnología CRISPR/Cas tiene un papel importante en campos como la agricultura (Zaidi, Mahas, Vanderschuren & Magdy, 2020), la bioingeniería y la biotecnología (Lau, 2018). En el futuro nuevas formas inimaginables de editar genomas se sumarán a la lista creciente del sistema CRISPR/Cas.

El funcionamiento general del sistema CRISPR consta de tres eventos principales: (i) la adquisición de espaciadores, conocida como la fase de adaptación, (ii) la biogénesis del CRISPR RNA (crRNA), y (iii) la interferencia (**Figura 2**). La adquisición comienza con la detección del DNA foráneo y su integración al cromosoma de la célula en el extremo terminal líder del *locus* CRISPR. La detección es mediante una secuencia de 2 a 5 nucleótidos llamada motivo adyacente del protoespaciador (PAM o *Protospacer Adjacent Motif*), identificada en el DNA foráneo con ayuda de las proteínas Cas. Después, la secuencia es añadida en el *locus* CRISPR como nuevos espaciadores que están flanqueados por secuencias repetidas (Hille *et al.*, 2018). La siguiente etapa consiste en la transcripción del *locus* CRISPR y los nuevos espaciadores, generando los pre-crRNAs

(precursores largos de crRNA), que se convierten en crRNAs maduros con ayuda de las RNAsas y algunas proteínas Cas. Por lo general, el crRNA se mantiene asociado a las proteínas Cas que participaron en su maduración; adicionalmente, en algunos tipos de sistemas CRISPR, el crRNA hibridiza con un RNA no codificante conocido como RNA trans-activado (tracrRNA), que es necesario tanto para el procesamiento del pre-crRNA como para la fase de interferencia (Faure *et al.*, 2019). En la siguiente fase, las nucleasas Cas son guiadas por el crRNA (o bien, el crRNA:tracrRNA) como una “maquinaria de interferencia” hacia el DNA invasor, reconociendo las secuencias PAM, permitiendo el corte en el DNA invasor en las regiones que tienen identidad con la secuencia del crRNA (silenciamiento); o bien, se utilizará este mismo mecanismo para agregar segmentos del DNA invasor en el *locus* CRISPR y tener un sistema de memoria que ayudará a prevenir futuras infecciones (Hille *et al.*, 2018).

Los sistemas CRISPR/cas como herramientas moleculares

Una pregunta interesante que se hicieron durante la descripción de este mecanismo fue ¿cómo se adquiere y evoluciona el sistema CRISPR? La respuesta tuvo lugar cuando las investigaciones identificaron numerosos componentes del arreglo CRISPR en distintos microorganismos, que presentaban cambios en cada *locus* entre grupos y especies. Actualmente, los sistemas CRISPR se dividen en dos grandes clases que contienen 6 tipos: clase 1 (tipos I, III y IV) y clase 2 (tipos II, V y VI) (Koonin & Makarova, 2019). Todos los tipos tienen similitudes y diferencias en las proteínas, los crRNAs, o en los mecanismos de adquisición e interferencia (**Figura 2 y Tabla I**). El sistema tipo I es el más distribuido en las bacterias y se caracteriza por formar un complejo multiproteico unido al crRNA conocido como “complejo asociado a CRISPR de defensa antiviral” o “Cascade”. Este complejo reconoce las secuencias de DNA invasoras y recluta a una nucleasa Cas3 para hacer el corte correspondiente. El sistema tipo III utiliza los complejos multi-Cas-proteína para la interferencia (Csm). En el sistema tipo II, la endonucleasa Cas9 requiere al tracrRNA para complementarse con el crRNA y, al madurar, reconoce la secuencia PAM de tres nucleótidos del DNA blanco (Shmakov *et al.*, 2017). En el sistema V,

Tabla I. Diferencias entre los sistemas CRISPR clase 1 y 2.

	Tipos	Módulo efector	Endonucleasa	Blanco	Requiere tracrRNA
Clase 1	I	Multiproteico	Cas3	DNA	No
	III		Cas10	DNA/RNA	No
	IV		?	?	?
Clase 2	II	Proteína con múltiples dominios	Cas9	DNA	Sí
	V		Cas12	DNA	Algunos subtipos
	VI		Cas13	RNA	No

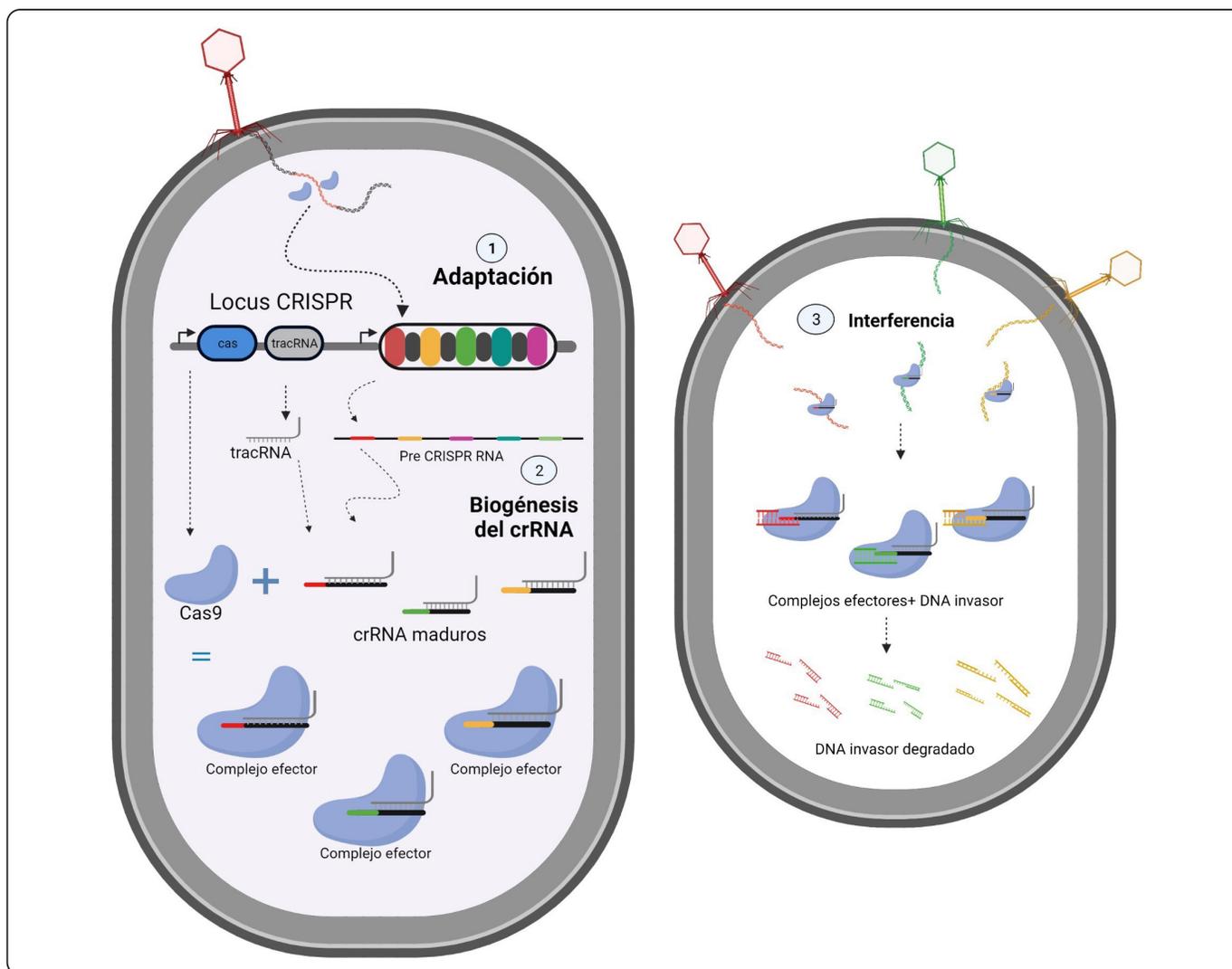


Figura 2. Estructura del *locus* CRISPR/Cas9 y eventos principales del sistema. El *locus* CRISPR está conformado por los genes que codifican a las proteínas Cas, el tracrRNA y el arreglo de secuencias repetidas (barras grises) intercaladas con secuencias espaciadoras (barras de colores). La secuencia líder se ubica entre el grupo de genes asociados a CRISPR y el arreglo de repeticiones interespaciadas. 1) La adaptación inicia cuando un bacteriófago (rojo) infecta a una célula hospedera por primera vez. Las proteínas Cas (azul) cortan la secuencia del DNA invasor, que será integrada al inicio del arreglo CRISPR del hospedero. 2) La biogénesis del crRNA comienza cuando el arreglo CRISPR es transcrito en pre-crRNA largos (pre CRISPR RNA). Asimismo, los transcritos de los genes tracrRNAs se unen a las secuencias espaciadoras del pre-crRNA; que, en conjunto con las proteínas Cas9 y la actividad de RNAsas, son necesarios para la formación del crRNA maduro. Los crRNAs maduros se mantienen asociados con las proteínas Cas9 para formar los complejos efector. 3) La interferencia ocurre cuando los bacteriófagos infectan a la célula hospedera por segunda vez, lo que activa a los complejos efector que reconocen a las secuencias invasoras, guiando a Cas9 a cortar y silenciar el material genético de los invasores. Elaboración personal usando BioRender.com.

la proteína efectora característica es Cas12. Al igual que en los sistemas de tipo II, algunos subtipos de sistemas V requieren el tracrRNA para la maduración del crRNA y la interferencia (Makarova *et al.*, 2020). Por último, el sistema tipo VI utiliza la proteína Cas13, una RNAsa que se activa al unirse al RNA blanco y que degrada tanto al RNA blanco como al RNA colateral. A diferencia de otras proteínas Cas, que reconocen un sitio PAM, Cas13 reconoce un sitio de

flanqueo del protoespaciador (PFS) en el RNA invasor (Hille *et al.*, 2018; Koonin & Makarova, 2019).

El sistema tipo II es el más utilizado como herramienta molecular para editar genomas de organismos. Este sistema contiene a la endonucleasa Cas9, que genera cortes de doble cadena en el DNA de manera específica guiada por el crRNA, atributo que facilita su uso en la biotecnología (Shmakov *et al.*, 2017).

El crRNA guía (gRNA) madura al formar un dúplex con la secuencia de tracrRNA, codificada río arriba del *locus* CRISPR/Cas. El dúplex crRNA:tracrRNA se puede utilizar como una molécula quimérica denominada sgRNA (single guide RNA). El sgRNA dirige de manera específica a Cas9 debido a que contiene tanto a los 20 nucleótidos del crRNA complementarios a la secuencia blanco en el extremo 5', como a la estructura de doble cadena que se forma en el extremo 3' del sgRNA. Una vez maduro, el dúplex crRNA:tracrRNA es requerido para que Cas9 se dirija hasta el sitio complementario del DNA invasor, llevando a cabo la fase de interferencia; se ha demostrado que el tracrRNA es indispensable para que funcione el sistema, ya que en su ausencia se pierde la actividad de Cas9 (Doudna & Charpentier, 2014; Jinek *et al.*, 2012).

En general, los sistemas CRISPR requieren del reconocimiento de una secuencia PAM, tanto para identificar a los protoespaciadores en la fase de adquisición como para dirigir a la maquinaria de interferencia. La secuencia específica del *motif* varía de acuerdo con la especie del hospedero del sistema CRISPR/Cas. La secuencia PAM que reconoce Cas9 de la bacteria *Streptococcus pyogenes* es NGG y para realizar cortes de doble cadena específicos de manera dirigida sólo es necesario cambiar la secuencia de 20 nt del espaciador en el crRNA a una secuencia adyacente a un sitio PAM. Los dominios tipo HNH y RuvC de Cas9 llevan a cabo el corte en cada una de las cadenas del DNA. Cuando se realizan mutaciones en alguno de los dos dominios, Cas9 realiza cortes en una sola cadena del DNA; a esta variante se le conoce como Cas9 *nickasa* (nCas9), mientras que las mutaciones en ambos dominios provocan la pérdida de actividad de la nucleasa de Cas9; sin embargo, se sigue uniendo al DNA de manera específica y se conoce como *dead* Cas9 (dCas9) (Doudna & Charpentier, 2014; Jinek *et al.*, 2012). En su ambiente nativo, Cas9 lleva a cabo la fase de interferencia en la respuesta inmune de *S. pyogenes*. Durante la invasión por bacteriófagos, se expresa el *cassette* CRISPR produciendo múltiples crRNAs que guían a Cas9 hacia el DNA invasor y lo cortan (**Figura 2**). Con la programación de Cas9 fue posible usar el sistema como herramienta molecular en la edición genética de manera precisa y dirigida en organismos que incluso no son modelo y aprovechar los mecanismos de reparación del DNA nativo.

EDICIÓN GENÉTICA DE LEVADURAS EN LA ERA DE CRISPR

Las levaduras son hongos unicelulares con aplicaciones biotecnológicas en las áreas de medio ambiente (biorremediación y degradación de contaminantes), biocontrol (protección de cultivos, seguridad agrícola y probióticos), investigación en ciencias biomédicas (descubrimiento de fármacos, metabolismo, resistencia a fármacos y elucidación de mecanismos de las enfermedades), investigación básica en ciencias biológicas (biología celular y molecular, genómica comparada y funcional, ingeniería de rutas metabólicas y biología de sistemas),

producción de proteínas (proteínas para uso farmacéutico, enzimas, hormonas, vacunas y toxinas), biocatálisis (productos farmacéuticos, productos químicos y biotransformadores), alimentos e ingredientes (enzimas, saborizantes, pigmentos, aminoácidos y ácidos orgánicos) y energías renovables (producción de biocombustibles y lipasas) (González *et al.*, 2020; Segal-Kischinevzky *et al.*, 2022). Durante la bioproducción con frecuencia se recurre a la ingeniería genética de levaduras que incluye la eliminación de genes, la sobreexpresión de proteínas o expresión heteróloga, lo que permite la optimización de la síntesis de metabolitos con valor agregado. Por lo tanto, el desarrollo de métodos y herramientas moleculares a partir de la edición genética de las levaduras con potencial biotecnológico es de gran interés para la academia y la industria.

Las primeras investigaciones que usaron ingeniería genética en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se remontan a principios de 1980, aunque su genoma se terminó de secuenciar en 1996 (Fraczek, Naseeb & Delneri, 2018). La mayoría de las herramientas moleculares de edición genética se han desarrollado en *S. cerevisiae* por ser de fácil manipulación, su trazabilidad genética y su genoma bien anotado (Wagner & Alper, 2016). Históricamente, la manipulación genética en *S. cerevisiae* es eficiente debido a su alta tasa de reparación dirigida por identidad (HDR, *Homology Directed Repair*). La edición genética en *S. cerevisiae* se realiza a través de la construcción de módulos de DNA generados por PCR y la integración de estos en su genoma mediante diferentes métodos de transformación (Wach, Brachat, Pöhlmann & Philippsen, 1994). Otros métodos de manipulación genética en levaduras que se basan también en la recombinación homóloga son: (i) el sistema de recombinación Cre-Lox, que hace uso de la recombinasa sitio-específica Cre y el reconocimiento de secuencias Lox que flanquean al gen de interés, (ii) el sistema *Delitto perfetto*, que utiliza de múltiples oligonucleótidos para modificar al gen de interés, y (iii) el empleo de meganucleasas, que son enzimas de restricción con alta especificidad al sitio que reconocen. Sin embargo, estos sistemas tienen desventajas porque la mutagénesis está restringida a la región del *cassette* integrado (Fraczek *et al.*, 2018).

Las nuevas tecnologías de manipulación genética como CRISPR/Cas tienen la capacidad de superar estos obstáculos y generar nuevas herramientas moleculares eficientes, que han revolucionado a la ingeniería genética de levaduras en las últimas décadas (Shan, Dai & Wang, 2021). La manipulación genética mediante CRISPR/Cas9 se ha hecho de manera exitosa tanto en *S. cerevisiae* como en otras levaduras del género *Candida* (incluyendo a *C. albicans*), *Cryptococcus neoformans*, *C. deneoformans*, *Yarrowia lipolytica*, *Pichia pastoris*, entre otras. El sistema CRISPR/Cas9 se ha utilizado de tres formas: i) inserción de uno o más vectores de expresión con el *cassette* de Cas9 y una o más secuencias de gRNA, integrando al genoma de la levadura el *cassette* de Cas9,

ii) expresión del gRNA desde un plásmido, y iii) inserción de la proteína Cas9 en complejo directo con las moléculas de gRNA de manera transitoria, sin requerir de la expresión del sistema (Arras *et al.*, 2016; Grahl, Demers, Crocker & Hogan, 2017; Fraczek *et al.*, 2018). En las primeras dos estrategias se expresa de manera constitutiva a Cas9, utilizando el promotor del gen de elongación de la traducción *TEF1*. Por otro lado, la sobreexpresión de Cas9 con el promotor de los genes que codifican para el transportador de la glucosa de alta afinidad y la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (*HXT7* o *TDH3*), resultó en efectos negativos para el crecimiento del cultivo y/o en la eficiencia de la transformación. Asimismo, las construcciones con promotores débiles resultaron en bajas eficiencias de edición genética (Raschmanová, Weninger, Glieder, Kovar & Vogl, 2018). Por lo tanto, ahora se sabe que es necesario elegir promotores específicos que expresen de forma constitutiva a Cas9 sin efectos negativos.

La implementación del sistema CRISPR/Cas9 se ha estandarizado mediante la transformación con un vector, que contiene tanto la secuencia que codifica para Cas9 como la secuencia del gRNA. Asimismo, se requiere la secuencia del molde o módulo de reparación, que puede estar codificada en el mismo vector, en otros vectores individuales, o se puede generar de manera independiente mediante PCR.

La modificación genética en levaduras que pertenecen al clado CTG se ha logrado al utilizar moldes de reparación que contienen la secuencia del gen *NAT1* o *SAT1* (confieren resistencia al antibiótico nourseotricina o estreptomycin, respectivamente), que está optimizada para evitar el uso del codón CTG. Esta estrategia se ha utilizado para mutar al gen *ADE2*, involucrado en la síntesis de la adenina (Min, Ichikawa, Woolford & Mitchell, 2016; Norton, Sherwood & Bennett, 2017; Vyas, Barrasa & Fink, 2015).

Grahl y colaboradores (2017) desarrollaron un sistema de edición genética con CRISPR/Cas9 libre de expresión para *C. lusitaniae*, *C. glabrata* y *C. auris*, el cual funciona en otros organismos (hongos filamentosos, plantas, algas, células de mamíferos, ratones y líneas celulares humanas). Este sistema consiste en formar un complejo *in vitro* (gRNA/Cas9) que después se introduce en la levadura mediante electroporación, para generar cortes de doble cadena de DNA en la región blanco. La electroporación se puede realizar en presencia de un *cassette* o módulo de recombinación que contiene al gen *NAT1*, el cual se inserta en la región blanco (Grahl *et al.*, 2017). Basado en este sistema, Wang, P., usó la proteína Cas9 en complejo con los gRNA para realizar un *knockout* del gen *GIB2* (proteína tipo Gβ/RACK1) en la levadura *Cryptococcus neoformans* (Wang, 2018).

A partir de 2012, el sistema de tipo II característico por usar Cas9 recibió un enorme interés debido a la revelación del funcionamiento de esta nucleasa y su alta tasa de eficiencia, lo que de inmediato sugirió posibles aplicaciones en la ingeniería genética. A inicios de 2013 se logró demostrar que este sistema realiza mutaciones específicas en el DNA de células procariontas y eucariotas, tan solo con expresar de manera heteróloga la proteína Cas9 junto con un RNA guía (sgRNA) complementario a la región que se desea editar en el genoma. El sgRNA funciona como crRNA maduro (es decir un complejo crRNA:tracrRNA) con una parte estructural y otra variable de 20 pares de bases (pb) que coincide con la región que se desea editar (Sternberg & Doudna, 2015; Raschmanová *et al.*, 2018). Posteriormente, este sistema se implementó de manera exitosa en la levadura modelo *S. cerevisiae* (DiCarlo *et al.*, 2013), que antes ya había sido editada genéticamente con la recombinación mediada por Cre-Loxp (Sauer, 1987), el método de “*Delitto Perfetto*” (Storici, Lewis & Resnick, 2001) y el uso de meganucleasas, que son técnicas costosas y requieren el doble de tiempo que la edición mediante CRISPR (**Tabla II**).

Tabla II. Ventajas y desventajas de las estrategias de edición genética en levaduras.

Método de edición genética	Ventajas	Desventajas	Optimización
Cre-LoxP	Eficiente en levaduras que utilizan la HR con mayor frecuencia (e.g., <i>S. cerevisiae</i>).	Poco versátil, consume demasiado tiempo y es costoso.	-
<i>Delitto Perfetto</i>	Eficiente y preciso en levaduras que utilizan la HR con mayor frecuencia (e.g., <i>S. cerevisiae</i>).	Poco versátil y usa múltiples oligonucleótidos.	-
Meganucleasas	Preciso cuando hay un sitio de corte específico.	Poco versátil, usa muchas nucleasas que encarecen los ensayos.	-
CRISPR/Cas	Versátil en múltiples especies, altamente eficiente, usa pocos componentes.	La sobreexpresión de Cas9 puede generar mutaciones no deseadas (<i>off target</i>).	Uso de nucleasas Cas recombinantes y diseño de RNA guías específicos. Utilizar cepas mutantes de algunos componentes de la NHEJ (<i>ku70Δ/ku80Δ</i>) o uso de inhibidores de la NHEJ.

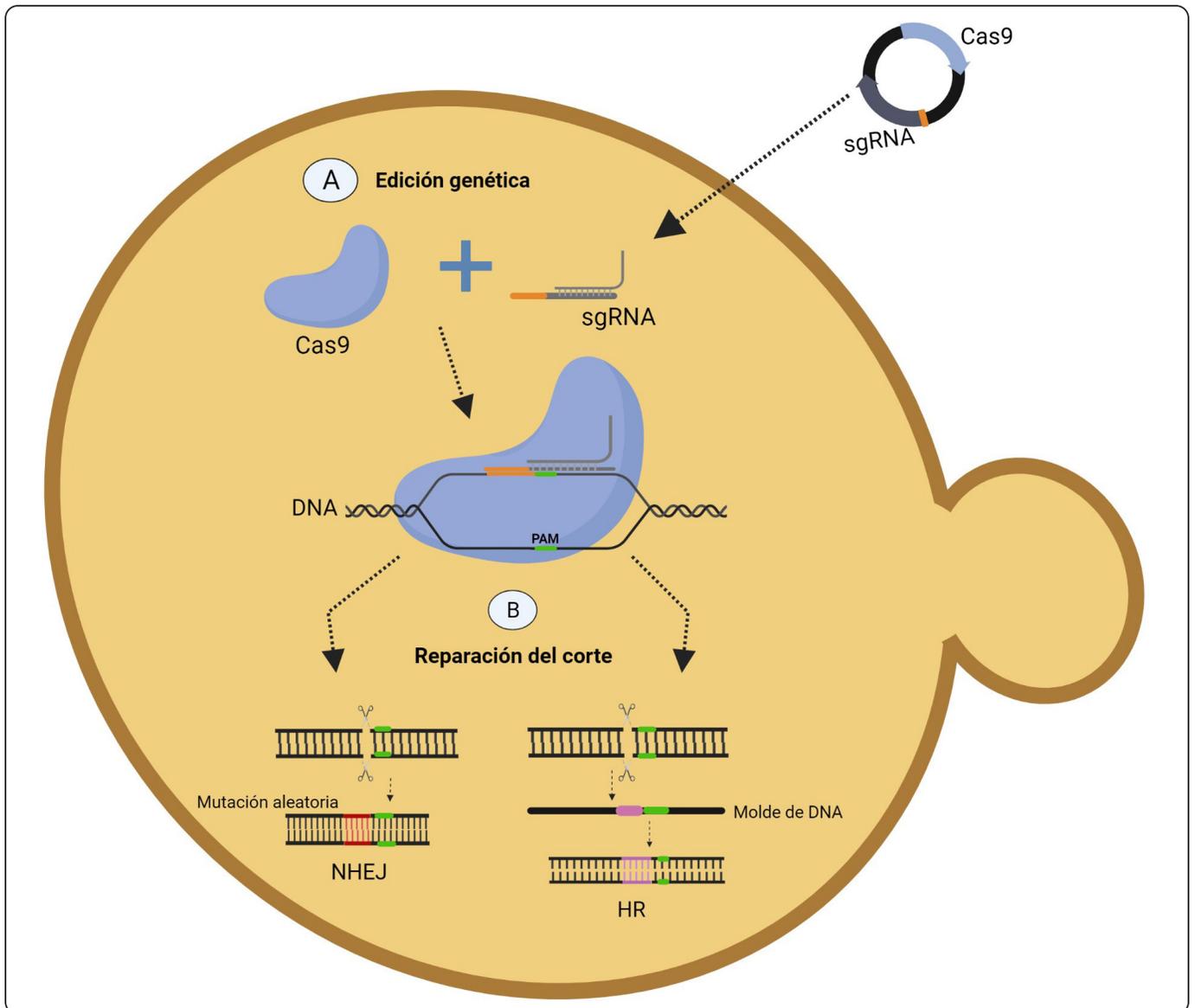


Figura 3. Tecnología de edición genética CRISPR/Cas9 en levaduras. A) Se transforma a la levadura con un vector que expresa los componentes del sistema CRISPR (Cas9 y sgRNA). La nucleasa Cas9 (azul) y el sgRNA (naranja-gris) forman un complejo que se une a la secuencia blanco del DNA, cortando la doble cadena adyacente al sitio PAM (verde). B) La reparación puede ocurrir por la vía de unión de los extremos no homólogos (NHEJ) que liga extremos y genera inserciones y/o deleciones (rojo). El corte también puede ser reparado por la vía de recombinación homóloga (HR), que requiere un molde de DNA con la modificación o mutaciones (rosa) que se desea integrar. Elaboración personal usando BioRender.com.

Existen algunos aspectos fundamentales que se deben considerar para la edición y reparación del corte de doble cadena del DNA mediante el sistema CRISPR/Cas9 (**Figura 3**). La reparación del corte es realizada de dos formas: la vía de recombinación homóloga (HR) que requiere un DNA molde con identidad a la secuencia dañada para corregir de manera correcta mediante su integración, o bien, por la unión de extremos no homólogos (NHEJ), que no requiere de un molde porque la reparación del corte se logra de manera inmediata por ligación. No obstante,

durante el proceso de reparación se pueden generar inserciones y/o deleciones de nucleótidos (indeles, inserciones-deleciones) (Fraczek *et al.*, 2018; Shan *et al.*, 2021). Se ha observado que la HR resulta muy eficiente en *S. cerevisiae*; sin embargo, en otras levaduras predomina la NHEJ sobre la HR, complicando la edición genética y como resultado se obtienen fenotipos no deseados (Raschmanová *et al.*, 2018). Por lo tanto, la implementación del sistema CRISPR/Cas9 en levaduras no convencionales resulta desafiante, pero prometedora.

IMPLEMENTACIÓN DE LAS TECNOLOGÍAS CRISPR EN LAS LEVADURAS

Existe una vasta documentación sobre la implementación del sistema CRISPR/Cas en *S. cerevisiae*. Esta herramienta molecular ha permitido incorporar y/o remover secuencias, activar o reprimir genes, etc. (Shan *et al.*, 2021). A continuación, se describen algunas investigaciones destacadas que lograron adaptar de manera exitosa el sistema CRISPR en distintas levaduras con potencial biotecnológico.

Generación de un *knockout*

La eliminación de la función de un gen o una región genómica se logra al generar mutaciones o removiendo secuencias de interés, utilizando a Cas9 o Cas12 y un sgRNA que guíe a la endonucleasa hacia un sitio específico de corte de doble cadena en la secuencia blanco del DNA. La reparación del corte dependerá de la capacidad del organismo; sin embargo, durante la misma se pueden introducir mutaciones o deleciones, con pérdida de la función y generar un *knockout* (*Ko*). Este tipo de mutaciones permite identificar la función de las regiones codificantes y regiones no codificantes con alguna función.

La mayor dificultad para generar un *Ko* en levaduras no convencionales es la falta de métodos y protocolos de transformación eficientes. Por ejemplo, en la levadura halotolerante *Debaryomyces hansenii* predomina la NHEJ como vía de reparación del DNA, que dificulta mutar sus genes. Sin embargo, Spasskaya y colaboradores (2021) lograron eliminar el gen que codifica para la fosforribosil aminoimidazol carboxilasa de la ruta de biosíntesis de la adenina (*ADE2*) mediante *CRISPRKo*. Utilizando la endonucleasa Cas9 y un sgRNA (**Figura 4**), obtuvieron la disrupción de este gen en hasta un 80% de las colonias transformadas. De igual manera, probaron agregar un templado de DNA para favorecer la reparación por HR, aumentando la eficiencia de eliminación del gen hasta un 90% con un sgRNA. Para remover el gen completo utilizaron dos sgRNAs, y se observó que el 38% de las colonias transformadas fueron *Ko*. Generar un *Ko* del gen *ADE2* tiene una gran ventaja para seleccionar las mutantes, ya que la eliminación de este gen puede ser fácilmente observada en el fenotipo de las colonias transformadas (WT, colonias blancas / mutante *ade2*, colonias rojas) (Spasskaya *et al.*, 2021). Tiempo después, Strucko y colaboradores (2021) interrumpieron la NHEJ con la finalidad de generar mutaciones puntuales o eliminar genes a través de la HR sin el uso de marcadores (Strucko *et al.*, 2021).

Estrategias de edición *multiplex*

En los últimos años, la utilización de los sistemas de edición genética CRISPR se ha incrementado con el fin de realizar mutaciones o deleciones en genes o en regiones puntuales del genoma (McCarty, Graham, Studená & Ledesma-Amaro, 2020). No obstante, este enfoque individual supone limitaciones importantes en cuanto a la eficiencia y a las aplicaciones biotecnológicas de los sistemas CRISPR, pues muchas veces

es necesario editar múltiples regiones genómicas para modificar e introducir varios genes con el fin de duplicar algunas vías metabólicas de interés (Adiego-Pérez *et al.*, 2019). Repetir el proceso de edición individual varias veces, no parece ser lo más adecuado; por fortuna, el sistema de edición genética CRISPR/Cas9 posee la ventaja de editar múltiples regiones del genoma durante una sola transformación, a diferencia de otros sistemas de edición genética, con la implementación de varios gRNA distintos junto con la proteína Cas9 (Minkenberg, Wheatley & Yang, 2017).

La tecnología de edición *multiplex* basada en el sistema CRISPR, es una herramienta versátil que puede ser empleada para modificar dos o más regiones del genoma de manera simultánea y precisa, posibilitando la eliminación, activación o represión de genes, e incluso la modificación del epigenoma (Abdelrahman, Wei, Rohila & Zhao, 2021; Minkenberg *et al.*, 2017). Existen diferentes estrategias generales utilizadas para la expresión de un sgRNA *multiplex* (Utomo, Hodgins & Ro, 2021). La estrategia más conocida y utilizada es la denominada *cassette* de expresión de un sgRNA de promotor individual, que emplea un *cassette* que contiene dos o más gRNA que incluyen un promotor y un terminador (Cao, Xiao & Yan, 2018). Un ejemplo de esta estrategia puede revisarse en el trabajo de Otoupal y colaboradores (2019), quienes investigaban cómo potenciar las capacidades de producción de los bioproductos de la levadura *Rhodospodium toruloides* mediante la implementación de CRISPR/Cas9 como herramienta de edición genética. Para ello, diseñaron cuatro sgRNAs en dos construcciones individuales de Cas9/sgRNA dirigidas a: (i) el gen que codifica para la fitoeno sintasa/licopeno ciclasa (*CAR2*, esencial en la biosíntesis de carotenoides), y (ii) el gen que codifica para la enzima involucrada en la síntesis *de novo* del ribonucleótido de pirimidina (*URA3*, esencial en la biosíntesis de uracilo). Ambas construcciones se implementaron de modo que la escisión se produjera en dos sitios separados de ~500 pb en ambos genes de la levadura *R. toruloides* (**Figura 5**). Los fenotipos obtenidos tras la transformación fueron los cambios en el color de la levadura de un tono rojizo a un tono blanquecino, evidenciando la pérdida de la capacidad de síntesis de los carotenoides. El análisis de los resultados indicó que la interrupción del gen *CAR2* en una sola transformación podía alcanzar hasta un 50% de la eficiencia de edición, mientras que para el gen *URA3*, la eficiencia de edición después de ser optimizada estuvo por arriba del 0.6%, demostrando que la edición *multiplex* funciona para editar el genoma de *R. toruloides* (Otoupal *et al.*, 2019). Otra estrategia utilizada para la edición *multiplex* consiste en emplear sgRNAs que se codifican y procesan mediante mecanismos basados en los sistemas nativos de CRISPR/Cas. En este sistema se introducen Cas9, tracrRNA y pre-crRNA; este último es transcrito a partir de un arreglo de crRNAs en un solo vector de expresión. Al igual que en el sistema nativo de CRISPR/Cas, los crRNAs pueden ser procesados por una RNasa III dependiente de tracrRNA. Sin embargo, al emplear tracrRNA para imitar el

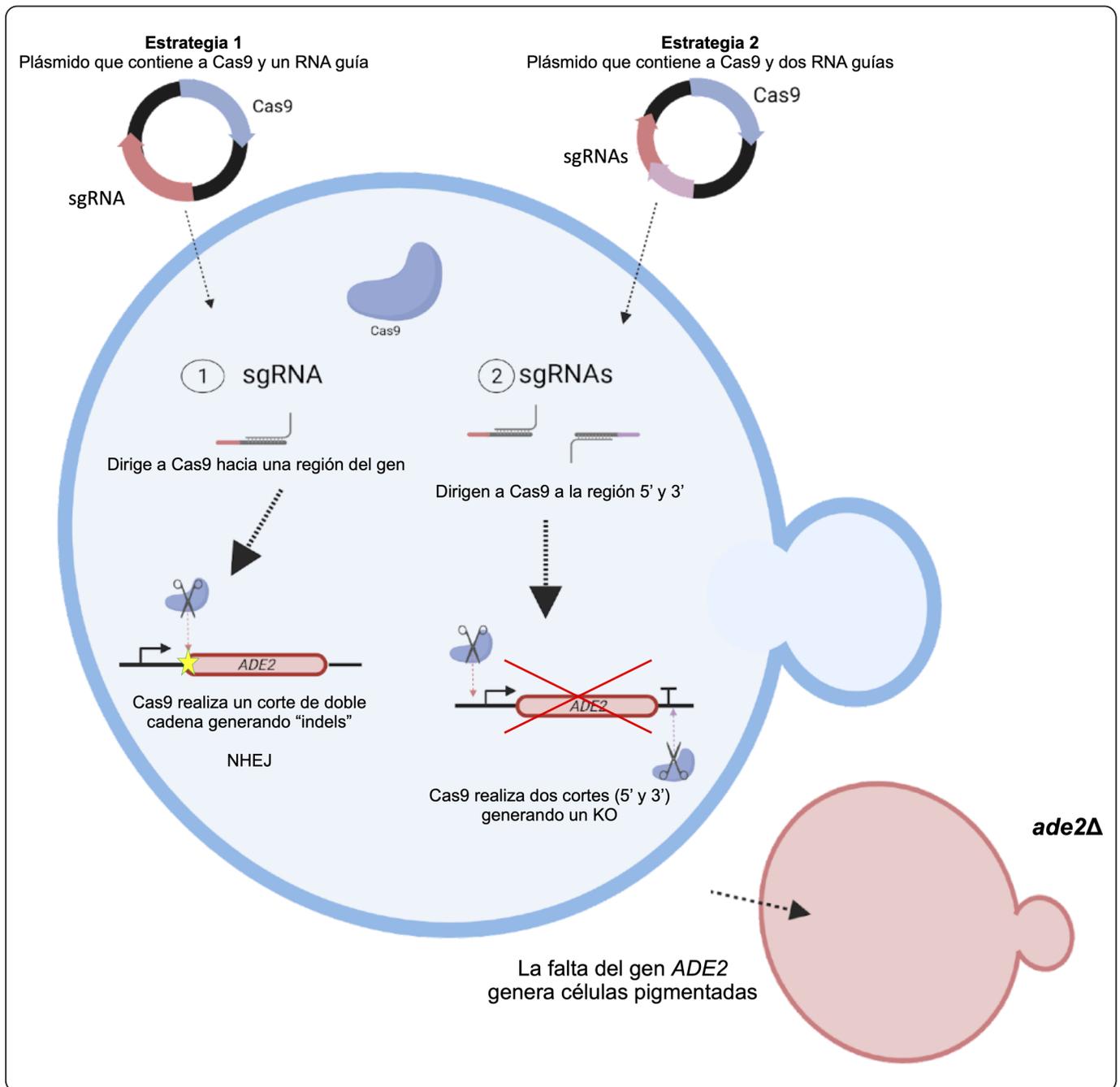


Figura 4. Tecnología de CRISPR/Cas9 *knockout* en la levadura *D. hanseni*. 1) Se transforma a la levadura con un plásmido que contiene al gen que codifica para Cas9 y un sgRNA que guíe a la endonucleasa hacia una región del gen *ADE2*. Cas9 (azul) realiza un corte de doble cadena que puede generar mutaciones (indeles representados con una estrella) durante la reparación NHEJ. La inactivación del gen *ADE2* provoca que las células adquieran una coloración roja, que facilita distinguir y seleccionar a las colonias que contienen la mutación. 2) Se transforma a la levadura con un plásmido que contenga al gen de Cas9 y dos sgRNA, los cuales dirigen a Cas9 hacia las regiones intergénicas 5' y 3' del gen *ADE2* provocando su completa eliminación (tachado en rojo). Las flechas horizontales simbolizan la transcripción del gen. Las flechas de colores indican los sitios de corte. Elaboración personal usando BioRender.com.

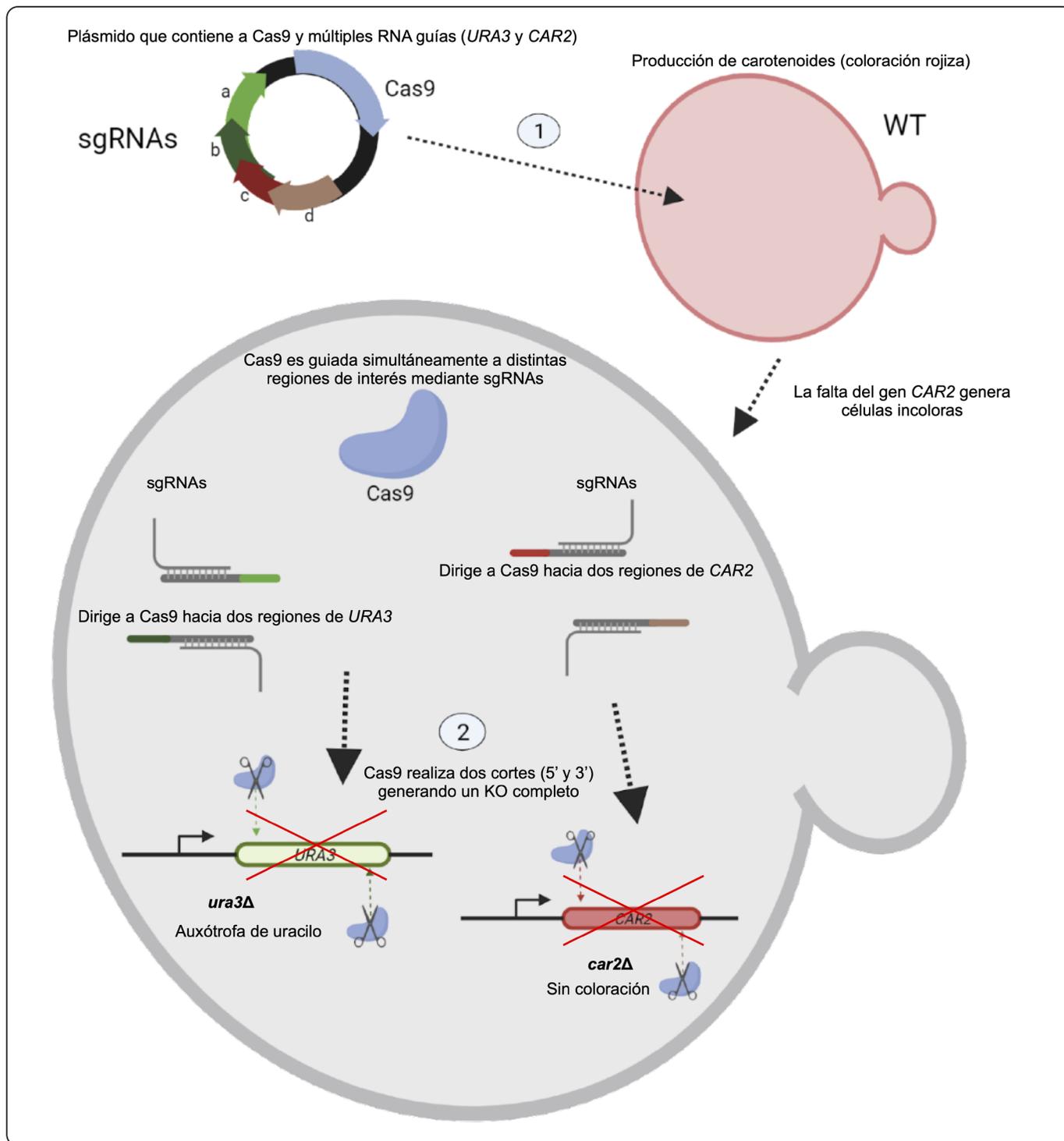


Figura 5. Tecnología de integración *multiplex* CRISPR/Cas9 en la levadura *R. toruloides*. 1) Se transforma la cepa WT (una levadura pigmentada por la producción de carotenoides que tiene un fenotipo rojizo) con un plásmido que contiene los *cassettes* que expresan múltiples sgRNAs complementarios a los genes *URA3* y *CAR2*. Los módulos “a” y “b” transcriben los sgRNAs complementarios al gen *URA3*, mientras que los módulos “c” y “d” transcriben los sgRNAs complementarios al gen *CAR2*. 2) Los sgRNAs “a” y “b” guían a Cas9 (azul) hacia las dos regiones del gen *URA3* que serán escindidas (verde). Del mismo modo, la expresión de los sgRNAs “c” y “d” permiten la escisión de dos regiones del gen *CAR2* (marrón). Después de la integración *multiplex*, como marcador de selección, el fenotipo de la levadura cambia de una coloración rojiza a una coloración blanquecina o sin color. Las flechas horizontales negras simbolizan la transcripción de los genes. Las flechas de colores indican los sitios de corte. Elaboración personal usando BioRender.com.

sistema nativo de CRISPR, disminuye la eficiencia, razón por la que esta estrategia no es muy recomendable (McCarty *et al.*, 2020). Un tercer método que es más efectivo consiste en la implementación de Cas12a (Cpf1) o Cas13a, que carece del requisito de emplear tracrRNAs para madurar los pre-crRNAs. Este método aprovecha la capacidad intrínseca de las Cas para escindir el pre-crRNA a través del reconocimiento de sus estructuras secundarias de horquilla, permitiendo la formación de crRNAs maduros y así procesar un gran número de sgRNAs (Zetsche *et al.*, 2017; McCarty *et al.*, 2020).

Edición de genomas por medio de integración multiplex

La mayoría de los trabajos que aplican la tecnología *multiplex* se basan en la preparación de vectores de expresión que buscan generar mutaciones puntuales o inactivar múltiples genes en específico. No obstante, para algunos fines resulta conveniente buscar la integración del constructo *multiplex* en el genoma del organismo con el que se desea trabajar (Horwitz *et al.*, 2015). Aunque existen diferentes estrategias metodológicas para realizar una integración genómica como las nucleasas efectoras de tipo activador de la transcripción (TALEN), la edición *multiplex* asistida por TALEN (TAME) o las nucleasas con dedos de zinc (ZFN), los científicos han optado por utilizar el sistema de edición basado en CRISPR/Cas, debido a que proporciona un enfoque más simple, barato, versátil y con mayores tasas de éxito (Montecillo, Chu & Bae, 2020).

La edición del genoma por *multiplex* es una técnica que permite reunir múltiples genes de interés en una sola transformación dentro del genoma de una célula (Utomo *et al.*, 2021). Malci y colaboradores (2020) realizaron una revisión sobre los principales métodos de integración *multiplex* al genoma basado en CRISPR/Cas en levaduras. En su investigación destacan los métodos de *Genome-Specific Multiplex Integration*, *Donor DNA Delivery Options*, y *Pre-Placed Gate Systems* (Malci, Walls & Ríos-Solís, 2020). El método de *Genome-Specific Multiplex Integration primer* se basa en la integración del sistema CRISPR/Cas9 conocido como método de integración delta (δ), e implica el uso de un retrotransposón de levadura (Ty), que tiene dos repeticiones directas terminales o secuencias δ . Las secuencias génicas heterólogas se insertan en la secuencia δ . La integración de CRISPR/Cas9 permite inducir múltiples rupturas de doble cadena en las secuencias δ , al admitir la integración simultánea de varias copias de grandes secuencias de DNA mediante HR (Malci *et al.*, 2020). El método *Pre-Placed Gate Systems* consiste en el uso de fragmentos sintéticos introducidos previamente y que sirven como puntos de inserción para la integración de genes. Los sgRNA deben reconocer estos sitios para facilitar la recombinación homóloga (Hou, Qin & Dai, 2018). Por último, el método *Donor DNA Delivery Options* se basa en la integración de plásmidos, con la ventaja de realizar cortes de doble cadena mediante CRISPR/Cas9 para mejorar la eficiencia de la integración *multiplex* en el genoma a través de la HR (Liu *et al.*, 2019). El método consiste en integrar a Cas9

en el genoma mientras que los sgRNAs se expresan a partir de un vector integrador linealizado (Malci *et al.*, 2020). Un ejemplo de este último método fue implementado por Horwitz y colaboradores (2015), en la levadura *Kluyveromyces lactis*, con la finalidad de probar la eficacia del método montado previamente en *S. cerevisiae*. Para este experimento, integraron una vía condensada del ácido mucónico, que está constituida por seis genes (*AroY*, *AroZ*, *AroD*, *CATA*, *AroF* y *AroB*), divididos en tres construcciones de integración que son guiadas a los loci *DIT1*, *ADH1* y *NDT80* (Figura 6). Adicionalmente, la cepa *K. lactis* ATCC 8585 fue transformada con Cas9 en el locus *GAL80*. Al finalizar los experimentos de transformación, los autores consiguieron la integración sin marcadores de las tres construcciones en el genoma de *K. lactis* en un solo paso, con una triple integración eficaz. Este método permite realizar pruebas rápidas de combinación de mutaciones, así como la creación de prototipos de rutas metabólicas completas, que aceleran de manera drástica la ingeniería de cepas para la investigación básica y aplicada en la fermentación industrial (Horwitz *et al.*, 2015).

Regulación de la transcripción por CRISPR de interferencia o activación

Los reguladores globales de la transcripción controlan múltiples genes en un organismo y hasta la fecha es difícil utilizarlos para regular la transcripción de un solo gen de forma específica. Actualmente, es posible modular la expresión de un gen mediante la utilización de una Cas9 inactiva y un sgRNA apropiado que en conjunto interfieren en los procesos de elongación transcripcional, la unión de las RNA polimerasas o factores de transcripción de manera específica. Esta incapacidad de Cas9 de funcionar como endonucleasa (dCas9 o *Dead Cas9*) ocurre debido a dos mutaciones puntuales (D10A y H840A) en los dominios RuvC y HNH, que son los responsables del corte en la doble cadena del DNA, lo cual evita que Cas9 realice cortes en el DNA, sin perder la capacidad de ser dirigida a un sitio específico en el genoma (Löbs, Schwartz & Wheeldon, 2017; Qi *et al.*, 2013; Zheng, Su & Qi, 2019). Se ha observado que dirigir dCas9 hacia el promotor de un gen puede bloquear físicamente a la maquinaria de la RNA polimerasa, interfiriendo y suprimiendo la transcripción. Esta herramienta se conoce como CRISPR *interference* (CRISPRi). Por el contrario, la herramienta CRISPR *activation* (CRISPRa) utiliza un activador transcripcional fusionado a dCas9 que aumenta la expresión del gen blanco (Zheng *et al.*, 2019). Román y colaboradores (2019) utilizaron este sistema para modular la expresión génica de *C. albicans* mediante la integración de dCas9 en su genoma bajo el control del sistema inducible *TET^{OFF}* (Román, Coman, Prieto, Alonso-Monge & Pla, 2019). De esta manera, controlaron la expresión del gen que codifica para la catalasa (*CAT1*) y fusionaron al gen de la proteína verde fluorescente (*GFP*) con la doxiciclina como señal de inhibición de la expresión de dCas9 y sus sgRNAs, evitando que dCas9 se traduzca y obstruya al promotor del gen (*pCAT1* o *P_{CAT1}*). Por lo tanto, el

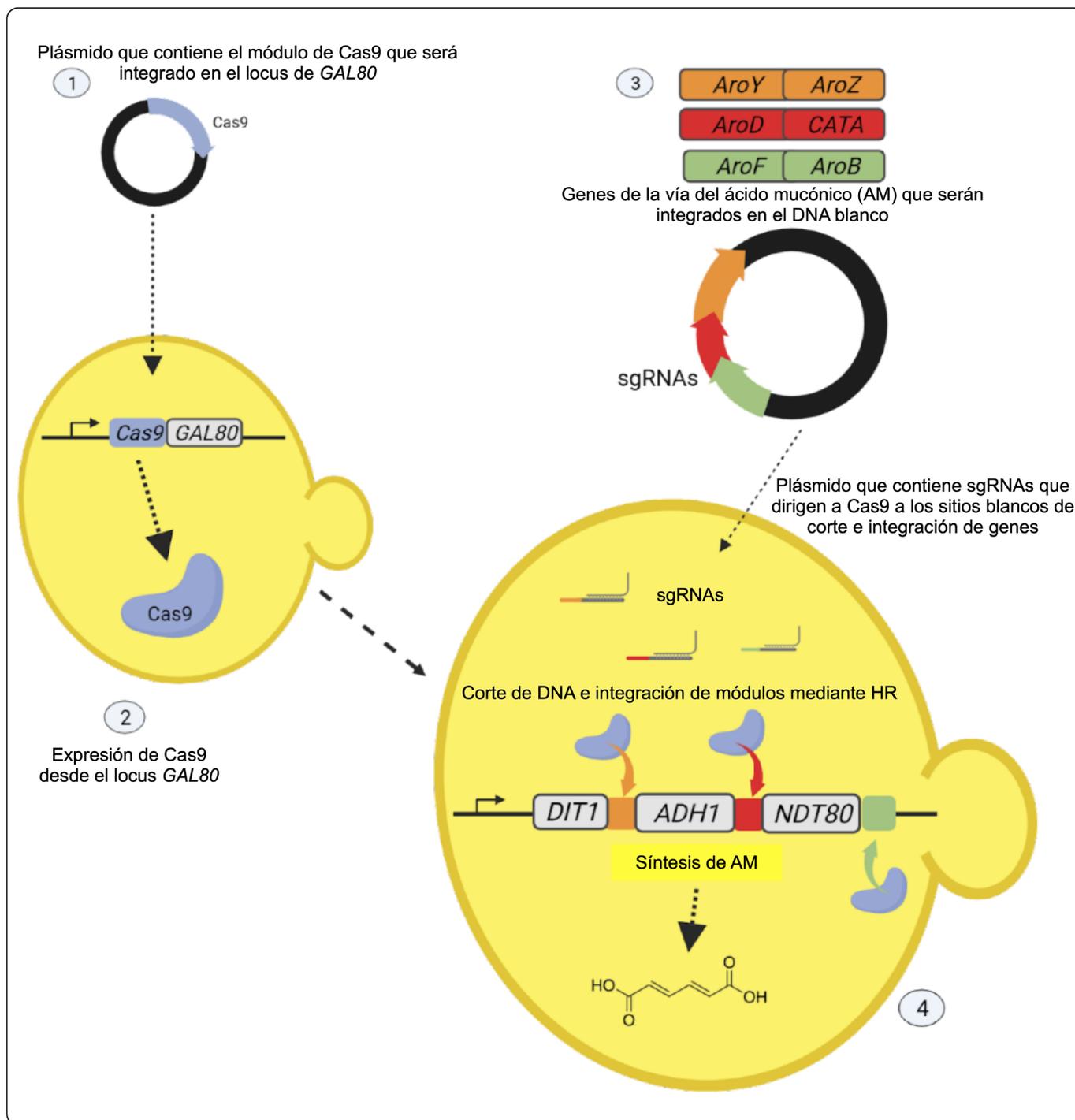


Figura 6. Tecnología *multiplex* en el genoma basado en CRISPR/Cas9 usando como ejemplo la integración de la vía del ácido mucónico en la levadura *K. lactis*. 1-2) Se transforma a la levadura con un plásmido que contiene la *cassette* para integrar a Cas9 en el locus de *GAL80*. 3) Se transforma a la levadura con un segundo plásmido que contiene un *cassette* con los genes *AroY*, *AroZ*, *AroD*, *CATA*, *AroF* y *AroB* (vía del ácido mucónico, AM), que están distribuidos en tres construcciones (naranja, roja y verde) y expresan tres sgRNAs que se integran en los loci *DIT1*, *ADH1* y *NDT80* tras la inducción de los cortes de doble cadena con Cas9 (azul) y la posterior reparación por HR. Las flechas horizontales negras simbolizan la transcripción de los genes. Las flechas de colores indican cada sitio de corte y la región de integración de cada módulo. Elaboración personal usando BioRender.com.

sistema inducible permite modular la expresión de un gen en un momento específico. La represión transcripcional específica por CRISPRi también se puede lograr por la expresión del dCas9 fusionada al represor Nrg1 (dCas9-Nrg1) y un sgRNA que tiene identidad con *pCAT1* (Figura 7).

Por otra parte, la activación transcripcional por CRISPRa se logra con un sistema de doble activación que utiliza dCas9 fusionada al activador transcripcional Gal4 y un sgRNA modificado que recluta a los activadores de la transcripción (Figura 8). La modificación es un módulo agregado al sgRNA en el extremo 3' de la molécula en forma de una estructura tallo-asa, que es reconocida por una proteína de unión al RNA fusionada a su vez con los factores de transcripción, como VP64 en el módulo MCP-VP64. Esta estrategia permite acoplar la actividad de CRISPRi o CRISPRa a un solo *cassette* de expresión, y tiene como ventaja modificar sólo la secuencia del sgRNA para activar o reprimir uno o más genes en el organismo (Zalatan *et al.*, 2015).

Edición genética a través de CRISPR Nickase

En el sistema CRISPR *Nickase* se utiliza una variante de Cas9 que genera un corte de hebra única, o *nick*, en el DNA (*nickasa* Cas9, nCas9). Este sistema ofrece la posibilidad de editar otras regiones además de las que se encuentran fuera del rango de la secuencia del sgRNA, a una distancia de hasta 59 pb del sitio del corte de la nCas9. Asimismo, a diferencia de los cortes de la doble hebra, los *nicks* inducen de manera preferencial a la reparación mediante HR sobre la vía de NHEJ, y disminuyen las inserciones y deleciones innecesarias en el sitio del corte de nCas9 (Satomura *et al.*, 2017) (Figura 9).

Como se mencionó, la endonucleasa Cas9 posee dos dominios activos con actividad de endonucleasa (HNH y RuvC). El dominio HNH corta a la hebra del DNA que contiene a la secuencia blanco (complementaria a la secuencia de sgRNA), mientras que el dominio RuvC corta a la otra hebra del DNA. Jinek y colaboradores (2012) desarrollaron variantes de Cas9 con mutaciones puntuales que inactivan la actividad catalítica de HNH y RuvC por separado. La variante H840A (His⁸⁴⁰→Ala⁸⁴⁰) corresponde a la forma inactiva de HNH, entre tanto D10A (Asp¹⁰→Ala¹⁰) es la forma inactiva de RuvC. Al inactivar a cualquiera de estos dos dominios y dejar sólo uno activo, se inducen cortes de hebra única, o *nicks*, en el DNA (Jinek *et al.*, 2012). Por otra parte, Gasiunas y colaboradores (2012) también desarrollaron mutantes de Cas9 con dominios HNH o RuvC inactivos (las mutantes N891A y D31A, respectivamente) y obtuvieron *nicks* en el DNA, corroborando que se necesita que ambos dominios se encuentren activos para inducir cortes de doble cadena en el DNA (Gasiunas, Barrangou, Horvath & Siksnys, 2012).

En las levaduras, los *nicks* pueden ser reparados por HR en una vía que depende sobre todo de las DNA polimerasas β , δ ó ϵ

(Caldecott, 2014; Vriend & Krawczyk, 2017), sin necesidad de algunas de las proteínas accesorias implicadas en la reparación de los *nicks* en las células de vertebrados, como PARP1 y XRCC1 (Semighini, Savoldi, Goldman & Harris, 2006). Sin embargo, no fue sino hasta el desarrollo del sistema CRISPR *Nickase* que fue posible empezar a investigar cuáles son las enzimas clave en la reparación de los *nicks* por recombinación homóloga en las levaduras (Satomura *et al.*, 2017; Smith *et al.*, 2009). El trabajo de Satomura y colaboradores (2017) aprovechó el sistema CRISPR *Nickase* desarrollado por ellos mismos, para incluir un experimento con mutantes en Rad51 y Rad52, unas proteínas que participan en la reparación de los cortes de doble cadena en *S. cerevisiae*. Estos experimentos permitieron observar que el sistema *Nickase* sólo podía editar al genoma si Rad52 que se encontraba expresada y fosforilada, por lo que sugirieron que la reparación de los *nicks* por HR en levaduras es dependiente de Rad52p e independiente de Rad51p (Satomura *et al.*, 2017).

Los grupos de investigación de Jinek (2012) y Gasiunas (2012) evidenciaron que los dominios HNH y RuvC generan *nicks* en el DNA de manera independiente (Gasiunas *et al.*, 2012; Jinek *et al.*, 2012). El grupo de investigación de Satomura (2017), desarrolló un plásmido que contenía los *cassettes* de la nCas9, el sgRNA y el DNA donador para introducir un codón de paro en el gen que confiere resistencia a la canavanina (*CAN1*) en *S. cerevisiae* (Satomura *et al.*, 2017).

En un sistema CRISPR/Cas9 convencional, la mutación debe de estar ubicada dentro de la región reconocida por el sgRNA, ya que si la secuencia queda intacta, la Cas9 puede reconocer otra vez el mismo sitio del corte después de la reparación por HR e inducir un corte de doble cadena. Este nuevo corte estimularía a la vía de NHEJ y generaría inserciones o deleciones de nucleótidos (indeles) innecesarios. Una *nickasa* Cas9 evita el reconocimiento del mismo sitio del corte por la nCas9 después de la recombinación homóloga, debido a que el *nick* en sí mismo se repara por HR sin inducir a un corte de doble cadena y, por lo tanto, no se generan indeles por la vía de NHEJ (Satomura *et al.*, 2017). Un aspecto importante de este sistema de edición es que debe de llevarse a cabo en condiciones en las que se promueva la proliferación celular, ya que la HR es estimulada durante las fases S y G2 del ciclo celular (Branzei & Foiani, 2008).

Para el caso de la edición genética de levaduras no convencionales, las *nickasas* se han fusionado con editores de bases como las citidina desaminasas (CDA), enzimas que catalizan la desaminación de la citosina y las convierten en uracilo. Es decir, la CDA primero convierte un par C:G en un par U:G. Después de una ronda de replicación o reparación del DNA, el uracilo, al ser complementario a la adenina, y la adenina a la timina, provoca una mutación C→T y el resultado es un par T:A en donde antes había un par C:G (Komor, Kim, Packer, Zuris & Liu, 2016). Sin embargo, en las células, la presencia de

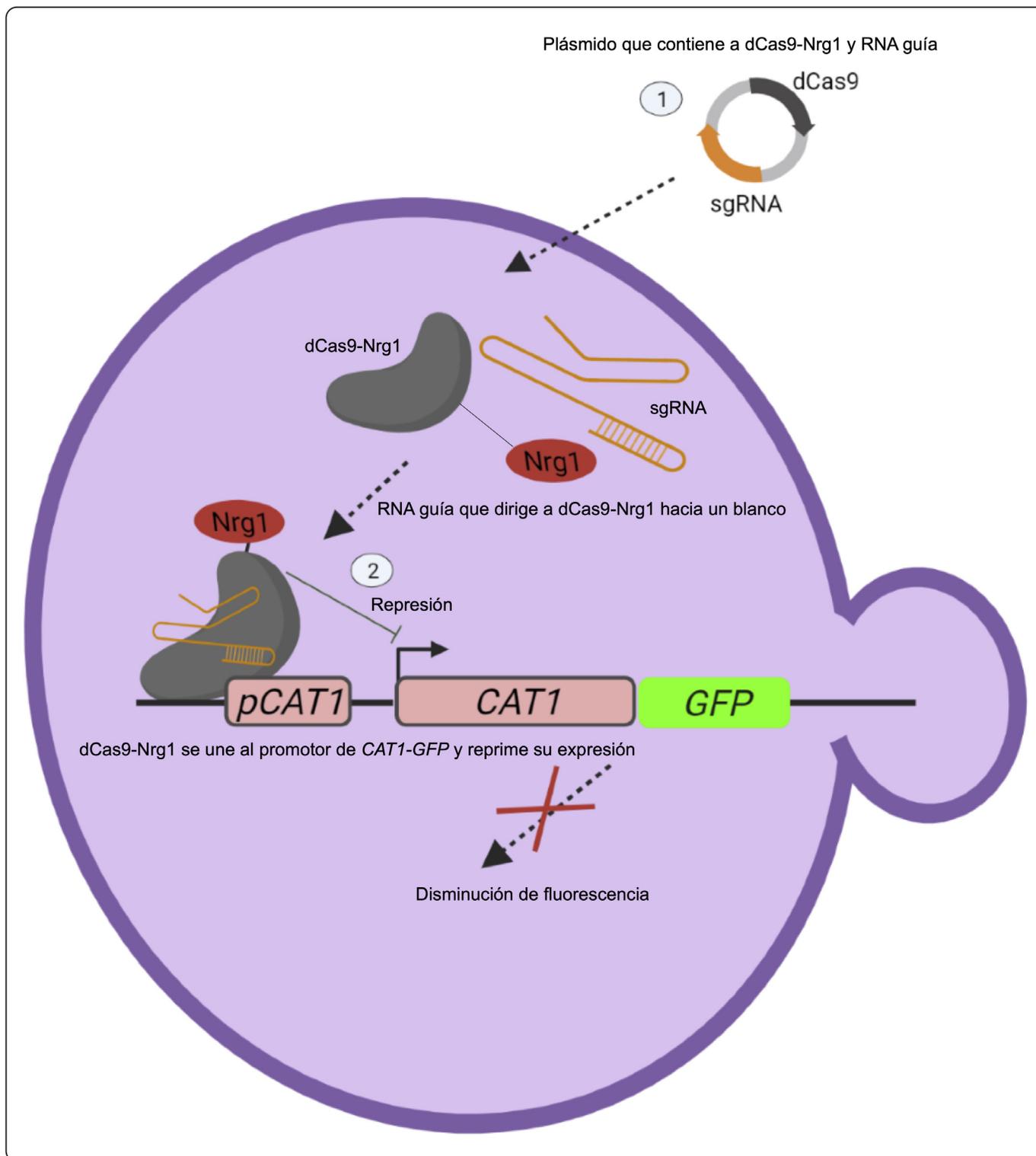


Figura 7. Tecnología de represión transcripcional CRISPR/dCas9-Nrg1 en la levadura *C. albicans*. Se transforma a la levadura con un plásmido que contiene la secuencia de dCas9 (gris) y un sgRNA (naranja) para dirigirla hacia la región promotora del gen *CAT1* (*pCAT1*) que codifica para una catalasa. El represor Nrg1 (rojo) se encuentra fusionado a dCas9 (dCas9-Nrg1), que reprime la expresión del gen *CAT1* fusionado a la secuencia de la proteína verde fluorescente (GFP). La represión disminuye la transcripción de *CAT1-GFP*, reflejada en la disminución de la intensidad de la fluorescencia. La flecha horizontal negra indica la transcripción del gen. Elaboración personal usando BioRender.com.

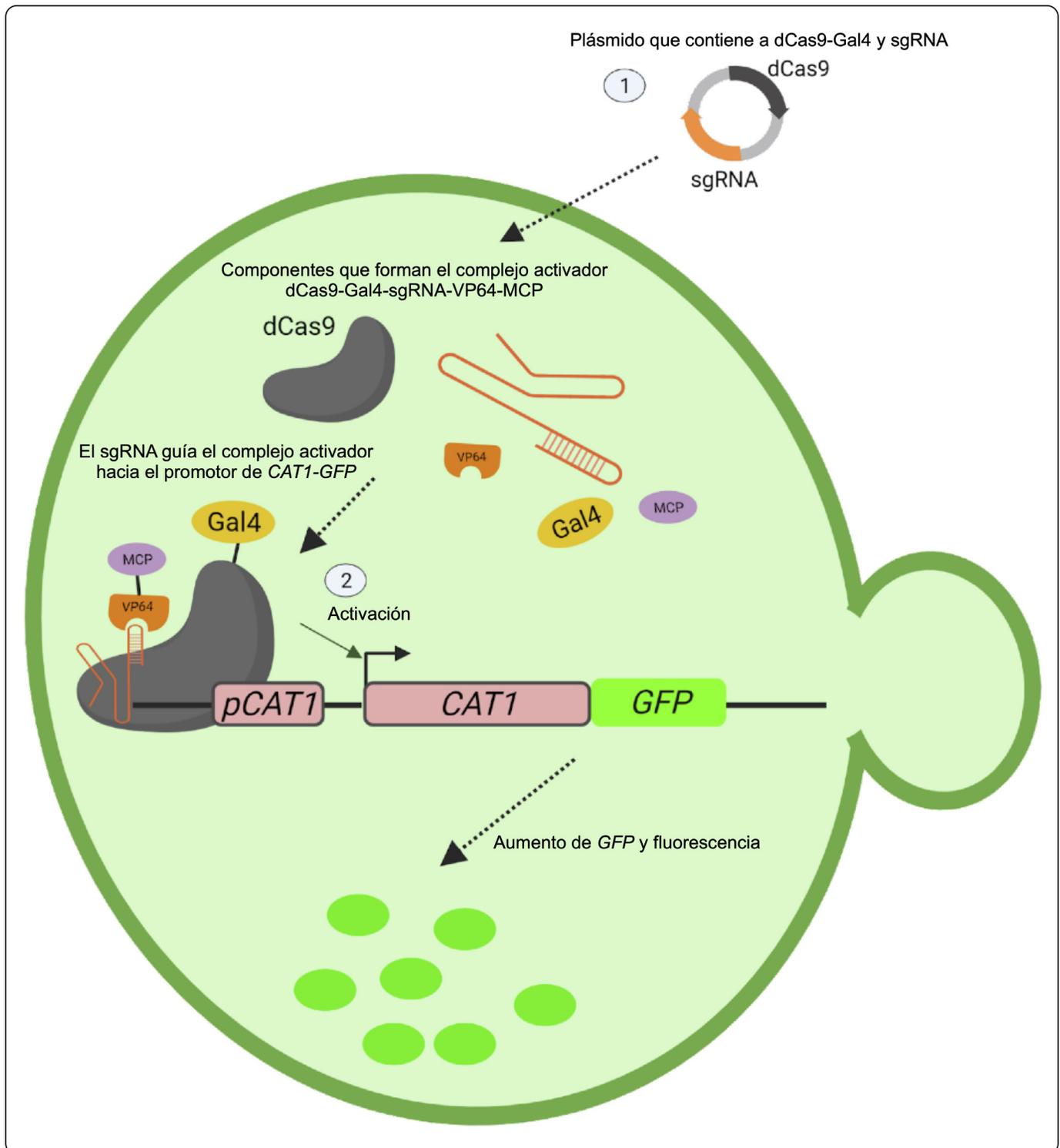


Figura 8. Tecnología de activación transcripcional CRISPR/dCas9 en la levadura *C. albicans*. Se transforma a la levadura con un plásmido que contiene la secuencia de dCas9-Gal4 y sgRNA-VP64, este complejo es capaz de incrementar la expresión del gen *CAT1* (catalasa) que está fusionado al gen de la proteína verde fluorescente (GFP). El complejo dCas9-Gal4-sgRNA es guiado al promotor de *CAT1* (*pCAT1*) y aumenta la transcripción de *CAT1-GFP*. Asimismo, el sgRNA contiene una modificación que permite reclutar al activador transcripcional VP64 (compuesto por cuatro copias en tándem de la proteína viral del herpes simple 16, VP16) y la proteína de unión (MCP). Por lo tanto, el gen *CAT1* incrementa su expresión en presencia de VP64-MCP y Gal4 reflejado en la detección de la intensidad de la fluorescencia de la GFP. Elaboración personal usando BioRender.com.

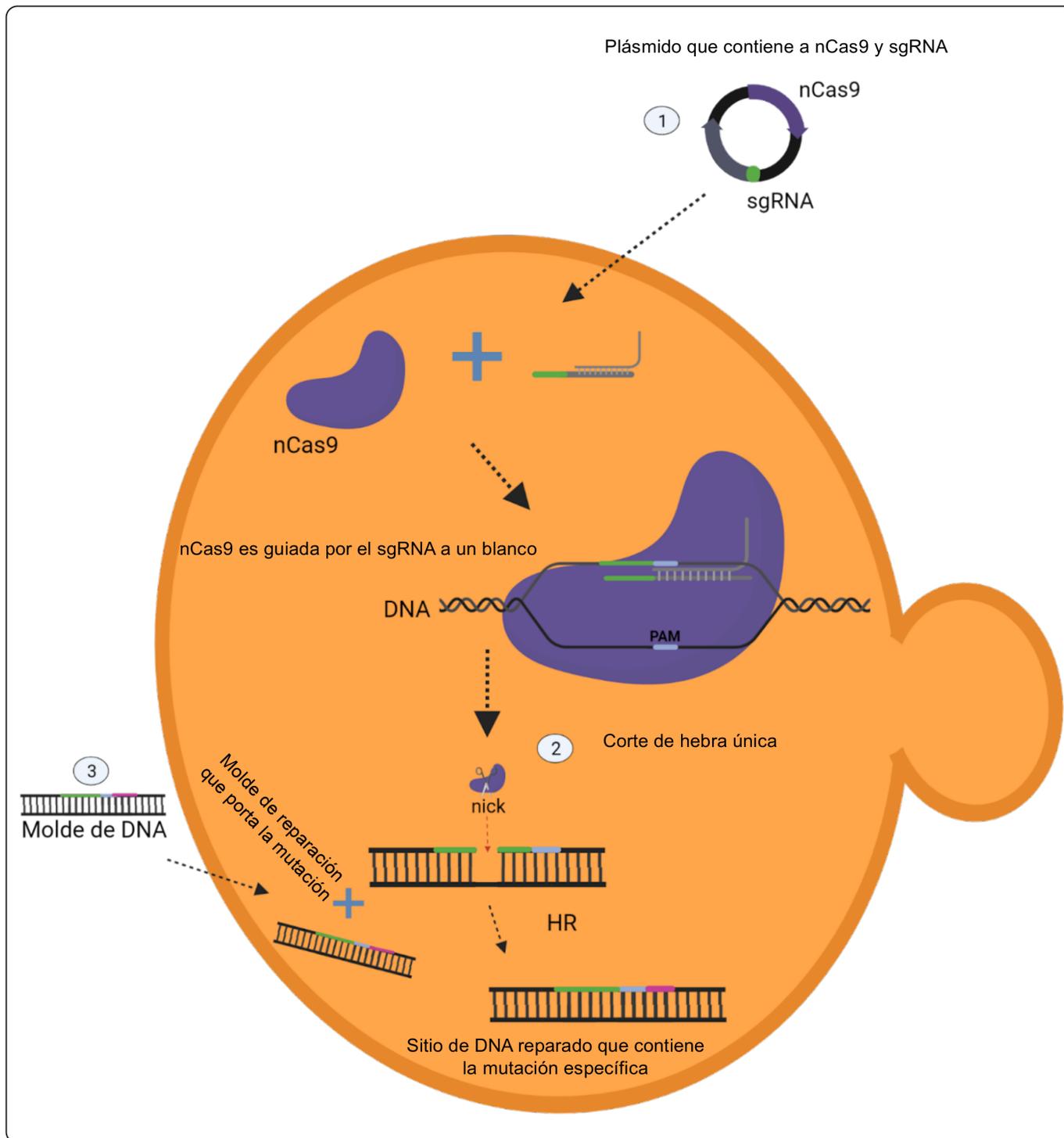


Figura 9. Tecnología de CRISPR Nickase. 1) Se transforma a la levadura con un plásmido que contiene los *cassettes* de expresión de nCas9 (morado) y el sgRNA. La secuencia del DNA que se usará como molde para la HR puede estar incluida en el *cassette*. 2) Una nCas9 genera los cortes de hebra única al tener inactivo uno de sus dos dominios (HNH o RuvC) con actividad de endonucleasa. La nCas9 corta a 3 pb río arriba del PAM. 3) La secuencia blanco es reparada vía HR utilizando un molde de DNA que, además de contener las regiones de homología con la secuencia editada, introduce una mutación (en rojo). El sistema CRISPR Nickase permite introducir la mutación, ya sea dentro o fuera de las regiones reconocidas por el sgRNA, así como fuera o dentro del PAM, a una distancia de hasta 59 pb del sitio del corte de la nickasa. Elaboración personal usando BioRender.com.

un par U:G estimula a las uracilo DNA glucosilasas (UDG), que eliminan al uracilo, y subsecuentemente, reclutan a la vía de reparación por escisión de bases (BER), que restaura al par C:G. Por lo tanto, Komor y colaboradores (2016) integraron un inhibidor de la UDG en este sistema de edición para proteger al par U:G. El papel de la nCas9 es aumentar aún más la proporción de mutaciones C→T. Un *nick* al lado de un apareamiento erróneo activa a la vía de reparación de los errores de emparejamiento (*mismatch repair*, MMR), lo que favorece la re-síntesis de la cadena con el *nick* y que, en este caso, es la que contiene a la guanina del par U:G. Es decir, el *nick* favorece la reparación del par U:G como un par U:A, en lugar de como un par C:G, posibilitando la obtención de un par T:A después de una ronda de replicación (Komor et al., 2016). Este sistema fue implementado en la levadura *S. cerevisiae* por Nishida y colaboradores (2016) y nombraron a este sistema *Target-AID* (*targeted activation-induced cytidine deaminase*) (Nishida et al., 2016). Su uso se extendió a la edición genética de las levaduras no convencionales como *Kluyveromyces marxianus* y *Y. lipolytica* (Bae, Park, Kim & Hahn, 2020; Nambu-Nishida, Nishida, Hasunuma & Kondo, 2017). En *K. marxianus*, el sistema *Target-AID* se utilizó para introducir mutaciones sin sentido (vía una mutación C→T) en dos genes involucrados en la vía de reparación por NHEJ (*NEJ1* y *DNL4*), aumentando la proporción de los eventos de reparación por HR (Nambu-Nishida et al., 2017). En *Y. lipolytica*, se introdujo una mutación sin sentido en el gen *TRP1*, involucrado en la biosíntesis del triptófano (Bae et al., 2020).

El sistema CRISPR *Nickase* es una herramienta que disminuye la citotoxicidad y la generación de indeles al favorecer la reparación por HR sobre NHEJ. La eficiencia de la mutagénesis es elevada en condiciones de alta proliferación celular, además de que las regiones editables son más extensas en comparación con otros sistemas de CRISPR/Cas. Acoplado con CDA e inhibidores de UDG, se ha utilizado con éxito para introducir mutaciones puntuales de C→T de manera muy específica, tanto en levaduras convencionales como en levaduras no convencionales.

CONCLUSIONES

El descubrimiento e implementación de CRISPR/Cas como una tecnología de edición genética y sus variantes, son ejemplos del constante incremento de las estrategias y las herramientas de modificación genética de microorganismos como las levaduras, que son de gran interés para la academia y la industria biotecnológica. CRISPR es actualmente uno de los sistemas de edición genética más diversos, que ofrece varias ventajas, entre ellas la disponibilidad de los diferentes plásmidos y estrategias de expresión, pero también cuenta con algunas limitaciones que no garantizan el funcionamiento de las estrategias creadas para otras especies, por lo que requiere de una optimización en cada modelo de estudio. La mayoría de los intentos exitosos preceden de una comprensión del funcionamiento del sistema CRISPR/

Cas *in vivo* y de la diversidad existente en los procariontes, así como del conocimiento genético de la especie que se desea editar, su vía de reparación del DNA y de la cantidad de sitios PAM disponibles en su genoma. La investigación previa, aunada a la secuenciación de nueva generación, hace relativamente fácil diseñar e implementar CRISPR/Cas de maneras creativas, conjuntas y desafiantes. El desarrollo acelerado de estas herramientas es un salto emocionante para la biotecnología de levaduras no convencionales que han sido poco investigadas y permitirán continuar la exploración de su potencial para convertirlas en especies modelo por sus atributos.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos en especial a la Dra. Norma Silvia Sánchez por todas sus recomendaciones y las sugerencias que permitieron mejorar este artículo. A Blanca Martínez-Castillo por su valioso apoyo técnico en la edición de las figuras. A los programas de Posgrado de Ciencias Bioquímicas y de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por las becas otorgadas: Alberto Zamora-Bello es estudiante de maestría del Posgrado en Ciencias Bioquímicas UNAM (CVU 1086350); Miguel Rosas-Paz, Diana Villarreal-Huerta e Ileana de la Fuente-Colmenares son estudiantes de maestría y doctorado del Posgrado en Ciencias Biológicas UNAM (CVU 966189; CVU 1185735; CVU 620472). Agradecemos al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT/DGAPA/UNAM IA208820 e IN225320) y al Programa de Apoyo a Proyectos para Innovar y Mejorar la Educación (PAPIME PE211619) por otorgar financiamiento para desarrollar nuestra investigación y fomentar la difusión de la ciencia. Las figuras se elaboraron usando BioRender.com (13, 14 y 15 de mayo de 2022).

REFERENCIAS

- Abdelrahman, M., Wei, Z., Rohila, J. S. & Zhao, K. (2021). Multiplex Genome-Editing Technologies for Revolutionizing Plant Biology and Crop Improvement. *Frontiers in Plant Science*, **12**, 1-15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.721203>
- Adiego-Pérez, B., Randazzo, P., Daran, J. M., Verwaal, R., Roubos, J. A., Daran-Lapujade, P. & Van Der Oost, J. (2019). Multiplex genome editing of microorganisms using CRISPR-Cas. *FEMS microbiology letters*, **366**(8), 1-19. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnz086>
- Arras, S. D. M., Chua, S. M. H., Wizrah, M. S. I., Faint, J. A., Yap, A. S. & Fraser, J. A. (2016). Targeted Genome Editing via CRISPR in the Pathogen *Cryptococcus neoformans*. *PLoS One*, **11**(10), 1-18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164322>
- Bae, S. J., Park, B. G., Kim, B. G. & Hahn, J. S. (2020). Multiplex Gene Disruption by Targeted Base Editing of *Yarrowia lipolytica* Genome Using Cytidine Deaminase Combined with the CRISPR/Cas9 System. *Biotechnology Journal*,

- 15(1)**, 1-10. <https://doi.org/10.1002/biot.201900238>
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richardss, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D. A. & Horvath, P. (2007). CRISPR Provides Against Viruses in Prokaryotes. *Science*, **315(5819)**, 1709-1712. <https://doi.org/10.1126/science.1138140>
- Barrangou, R. & Horvath, P. (2017). A decade of discovery: CRISPR functions and applications. *Nature Microbiology*, **2**, 1-9. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.92>
- Branzei, D. & Foiani, M. (2008). Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **9**, 297-308. <https://doi.org/10.1038/nrm2351>
- Caldecott, K. W. (2014). DNA single-strand break repair. *Experimental Cell Research*, **329(1)**, 2-8. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2014.08.027>
- Cao, J., Xiao, Q. & Yan, Q. (2018). The multiplexed CRISPR targeting platforms. *Drug Discovery Today: Technologies*, **28**, 53-61. <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2018.01.001>
- de Puig, H., Lee, R. A., Najjar, D., Tan, X., Soenksen, L. R., Angenent-Mari, N. M., Donghia, N. M., Weckman, N. E., Ory, A., Ng, C. F., Nguyen, P. Q., Mao, A. S., Ferrante, T. C., Lansberry, G., Sallum, H., Niemi, J. & Collins, J. J. (2021). Minimally instrumented SHERLOCK (miSHERLOCK) for CRISPR-based point-of-care diagnosis of SARS-CoV-2 and emerging variants. *Science Advances*, **7(32)**, 1-11. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abh2944>
- DiCarlo, J. E., Norville, J. E., Mali, P., Ríos, X., Aach, J. & Church, G. M. (2013). Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Research*, **41(7)**, 4336-4343. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt135>
- Doudna, J. A. & Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, **346(6213)**, 1-9. <https://doi.org/10.1126/science.1258096>
- Eisenstein, M. (2021). Fix the gene, cure the disease. *Nature*, **596**, S2-S4. <https://doi.org/10.1038/d41586-021-02138-w>
- Faure, G., Shmakov, S. A., Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Crawley, A. B., Barrangou, R. & Koonin, E. V. (2019). Comparative genomics and evolution of trans-activating RNAs in Class 2 CRISPR-Cas systems. *RNA Biology*, **16(4)**, 435-448. <https://doi.org/10.1080/15476286.2018.1493331>
- Fraczek, M. G., Naseeb, S. & Delneri, D. (2018). History of genome editing in yeast. *Yeast*, **35(5)**, 361-368. <https://doi.org/10.1002/yea.3308>
- Gasiunas, G., Barrangou, R., Horvath, P. & Siksnys, V. (2012). Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **109(39)**, E2579-E2586. <https://doi.org/10.1073/pnas.1208507109>
- Geurts, M. H., de Poel, E., Amatngalim, G. D., Oka, R., Meijers, F. M., Kruisselbrink, E., van Mourik, P., Berkers, G., de Winter-de Groot, K. M., Michel, S., Muilwijk, D., Aalbers, B. L., Mullenders, J., Boj, S. F., Suen, S. W., Brunsveld, J. E., Janssens, H. M., Mall, M. A., Graeber, S. Y., van Boxtel, R., van der Ent, K. C., Beekman, J. & Clevers, H. (2020). CRISPR-Based Adenine Editors Correct Nonsense Mutations in a Cystic Fibrosis Organoid Biobank. *Cell Stem Cell*, **26(4)**, 503-510.e7. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2020.01.019>
- Grahl, N., Demers, E. G., Crocker, A. W. & Hogan, D. A. (2017). Use of RNA-protein complexes for genome editing in non-*albicans Candida* species. *mSphere*, **2(3)**, 1-9. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00218-17>
- González, J., Romero-Aguilar, L., Matus-Ortega, G., Pardo, J. P., Flores-Alanis, A. & Segal-Kischinevzky, C. (2020). Levaduras adaptadas al frío: el tesoro biotecnológico de la Antártica. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, **23**, 1-14. <https://doi.org/10.22201/fez.23958723e.2020.0.267>
- Groenen, P. M. A., Bunschoten, A. E., Van Soolingen, D. & van Embden, J. D. A. (1993). Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*; application for strain differentiation by a novel typing method. *Molecular Microbiology*, **10(5)**, 1057-1065. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb00976.x>
- He, S. (2020). The first human trial of CRISPR-based cell therapy clears safety concerns as new treatment for late-stage lung cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, **5(168)**, 1-2. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-00283-8>
- Hille, F., Richter, H., Wong, S. P., Bratovič, M., Ressel, S. & Charpentier, E. (2018). The Biology of CRISPR-Cas: Backward and Forward. *Cell*, **172(6)**, 1239-1259. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.11.032>
- Horwitz, A. A., Walter, J. M., Schubert, M. G., Kung, S. H., Hawkins, K., Platt, D. M., Hernday, A. D., Mahatdejkul-Meadows, T., Szeto, W., Chandran, S. S. & Newman, J. D. (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>
- Hou, S., Qin, Q. & Dai, J. (2018). Wicket: a versatile tool for the integration and optimization of exogenous pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *ACS Synthetic Biology*, **7(3)**, 782-788. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.7b00391>
- Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M. & Nakamura, A. (1987). Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isoenzyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of Bacteriology*, **169(12)**, 5429-5433. <https://doi.org/10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987>
- Jansen, R., Van Embden, J. D. A., Gaastra, W. & Schouls, L. M. (2002). Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Molecular Microbiology*, **43(6)**, 1565-1575. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x>
- 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**(6096), 816–821. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>
- Kaiser, J. (2021). CRISPR helps a blind woman see, but doesn't help all patients. *Science*, Disponible en línea: <https://doi.org/10.1126/science.acx9258> (acceso en mayo de 2022)
- Kaminski, M.M., Abudayyeh, O.O., Gootenberg, J.S., Zhang, F. & Collins, J. J. (2021). CRISPR-based diagnostics. *Nature Biomedical Engineering*, **5**, 643–656. <https://doi.org/10.1038/s41551-021-00760-7>
- Katti, A., Diaz, B.J., Caragine, C.M., Sanjana, N. E. & Dow, L. E. (2022). CRISPR in cancer biology and therapy. *Nature Reviews Cancer*, **22**, 259–279. <https://doi.org/10.1038/S41568-022-00441-W>
- Komor, A. C., Kim, Y. B., Packer, M. S., Zuris, J. A. & Liu, D. R. (2016). Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*, **533**, 420–424. <https://doi.org/10.1038/nature17946>
- Koonin, E. V. & Makarova, K. S. (2019) Origins and evolution of CRISPR-Cas systems. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, **374**(1772), 1-16. <https://doi.org/10.1098/rstb.2018.0087>
- Lau, C.-H. (2018). Applications of CRISPR-Cas in Bioengineering, Biotechnology, and Translational Research. *The CRISPR Journal*, **1**(6), 379–404. <https://doi.org/10.1089/crispr.2018.0026>
- Ledford, H. (2020). CRISPR treatment inserted directly into the body for first time. Experiment tests a gene-editing therapy for a hereditary blindness disorder. *Nature*, **579**, 185. <https://doi.org/10.1038/d41586-020-00655-8>
- Ledford, H. & Callaway, E. (2020). Pioneers of revolutionary CRISPR gene editing win chemistry Nobel. *Nature*, **586**, 346-347. <https://doi.org/10.1038/d41586-020-02765-9>
- Liu, M., Rehman, S., Tang, X., Gu, K., Fan, Q., Chen, D. & Ma, W. (2019). Methodologies for improving HDR efficiency. *Frontiers in Genetics*, **9**, 1-9. <https://doi.org/10.3389/fgene.2018.00691>
- Liu, T. Y., Knott, G. J., Smock, D. C. J., Desmarais, J. J., Son, S., Bhuiya, A., Jakhanwal, S., Prywes, N., Agrawal, S., Díaz De León Derby, M., Switz, N. A., Armstrong, M., Harris, A. R., Charles, E. J., Thornton, B. W., Fozouni, P., Shu, J., Stephens, S. I., Kumar, G. R., Zhao, C., Mok, A., T. Iavarone, A., Escajeda, A., McIntosh, R., Kim, S., Dugan, E., IGI testing Consortium, Polland, K., Tan, M., Ott, M., Fletcher, D., Lareau, L., Hsu, P., Savage, D & Doudna, J. A. (2021). Accelerated RNA detection using tandem CRISPR nucleases. *Nature Chemical Biology*, **17**, 982–988. <https://doi.org/10.1038/s41589-021-00842-2>
- Löbs, A. K., Schwartz, C. & Wheeldon, I. (2017). Genome and metabolic engineering in non-conventional yeasts: Current advances and applications. *Synthetic and Systems Biotechnology*, **2**(3), 198-207. <https://doi.org/10.1016/j.synbio.2017.08.002>
- Makarova, K. S., Grishin, N. V., Shabalina, S. A., Wolf, Y. I. & Koonin, E. V. (2006). A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biology Direct*, **1**(7), 1-26. <https://doi.org/10.1186/1745-6150-1-7>
- Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Alkhnbashi, O. S., Costa, F., Shah, S. A., Saunders, S. J., Barrangou, R., Brouns, S. J. J., Charpentier, E., Haft, D. H., Horvath, P., Moineau, S., Mojica, F. J. M., Terns, R. M., Terns, M. P., White, M. F., Yakunin, A. F., Garrett, R. A., van der Oost, J. Backofen, R. & Koonin, E. V. (2015). An updated evolutionary classification of CRISPR–Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*, **13**, 722–736. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3569>
- Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Iranzo, J., Shmakov, S. A., Alkhnbashi, O. S., Brouns, S. J. J., Charpentier, E., Cheng, D., Haft, D. H., Horvath, P., Moineau, S., Mojica, F. J. M., Scott, D., Shah, S. A., Siksny, V., Terns, M. P., Venclovas, Č., White, M. F., Yakunin, A. F., Yan, W., Zhang, F., Garret, R. A., Backofen, R., van der Oost, J., Barrangou, R. & Koonin, E. V. (2020). Evolutionary classification of CRISPR–Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. *Nature Reviews Microbiology*, **18**, 67–83. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0299-x>
- Malci, K., Walls, L. E. & Rios-Solis, L. (2020). Multiplex genome engineering methods for yeast cell factory development. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, **8**, 1-21. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.589468>
- McCarty, N. S., Graham, A. E., Studená, L. & Ledesma-Amaro, R. (2020). Multiplexed CRISPR technologies for gene editing and transcriptional regulation. *Nature Communications*, **11**, 1-13. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15053-x>
- Min, K., Ichikawa, Y., Woolford, C. A. & Mitchell, A. P. (2016). *Candida albicans* gene deletion with a transient CRISPR-Cas9 system. *mSphere*, **1**(3), 1-9. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00130-16>
- Minkenbergh, B., Wheatley, M. & Yang, Y. (2017). CRISPR/Cas9-Enabled Multiplex Genome Editing and Its Application. En: Weeks, D. P & Yang, B. (eds.) *Gene Editing in Plants. Progress in Molecular Biology and Translational Science*, **149**, 111–132. <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2017.05.003>
- Mojica, F. J. M., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J. & Soria, E. (2005). Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of Molecular Evolution*, **60**, 174–182. <https://doi.org/10.1007/s00239-004-0046-3>
- Mojica, F. J. M., Juez, G. & Rodríguez-Valera, F. (1993). Transcription at different salinities of *Haloflex mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites. *Molecular Microbiology*, **9**(3), 613–621. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb01721.x>
- Montecillo, J. A. V., Chu, L. L. & Bae, H. (2020). CRISPR-Cas9

- system for plant genome editing: Current approaches and emerging developments. *Agronomy*, **10(7)**, 1-41. <https://doi.org/10.3390/agronomy10071033>
- Nambu-Nishida, Y., Nishida, K., Hasunuma, T. & Kondo, A. (2017). Development of a comprehensive set of tools for genome engineering in a cold- and thermo-tolerant *Kluyveromyces marxianus* yeast strain. *Scientific Reports*, **7**, 1-8. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08356-5>
- Nishida, K., Arazoe, T., Yachie, N., Banno, S., Kakimoto, M., Tabata, M., Mochizuki, M., Miyabe, A., Araki, M., Hara, K. Y., Shimatani, Z. & Kondo, A. (2016). Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems. *Science*, **353(6305)**, 1-8. <https://doi.org/10.1126/science.aaf8729>
- Norton, E. L., Sherwood, R. K. & Bennett, R. J. (2017). Development of a CRISPR-Cas9 system for efficient genome editing of *Candida lusitanae*. *mSphere*, **2(3)**, 1-10. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00217-17>
- Otoupal, P. B., Ito, M., Arkin, A. P., Magnuson, J. K., Gladden, J. M. & Skerker, J. M. (2019). Multiplexed CRISPR-Cas9-based genome editing of *Rhodospiridium toruloides*. *mSphere*, **4(2)**, 1-13. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00099-19>
- Qi, L. S., Larson, M. H., Gilbert, L. A., Doudna, J. A., Weissman, J. S., Arkin, A. P. & Lim, W. A. (2013). Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell*, **152(5)**, 1173-1183. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.022>
- Raschmanová, H., Weninger, A., Glieder, A., Kovar, K. & Vogl, T. (2018). Implementing CRISPR-Cas technologies in conventional and non-conventional yeasts: Current state and future prospects. *Biotechnology Advances*, **36(3)**, 641-665. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.01.006>
- Román, E., Coman, I., Prieto, D., Alonso-Monge, R. & Pla, J. (2019). Implementation of a CRISPR-based system for gene regulation in *Candida albicans*. *mSphere*, **4(1)**, 1-13. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00001-19>
- Satomura, A., Nishioka, R., Mori, H., Sato, K., Kuroda, K. & Ueda, M. (2017). Precise genome-wide base editing by the CRISPR Nickase system in yeast. *Scientific Reports*, **7**, 1-10. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02013-7>
- Sauer, B. (1987). Functional expression of the cre-lox site-specific recombination system in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, **7(6)**, 2087-2096. <https://doi.org/10.1128/mcb.7.6.2087-2096.1987>
- Segal-Kischinevsky, C., Romero-Aguilar, L., Alcaraz, L.D., López-Ortiz, G., Martínez-Castillo, B., Torres-Ramírez, N., Sandoval, G. & González, J. (2022). Yeasts Inhabiting Extreme Environments and Their Biotechnological Applications. *Microorganisms*, **10(4)**, 1-26. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10040794>
- Semighini, C. P., Savoldi, M., Goldman, G. H. & Harris, S. D. (2006). Functional characterization of the putative *Aspergillus nidulans* poly(ADP-ribose) polymerase homolog PrpA. *Genetics*, **173(1)**, 87-98. <https://doi.org/10.1534/genetics.105.053199>
- Shan L., Dai Z. & Wang Q. (2021). Advances and Opportunities of CRISPR/Cas Technology in Bioengineering Non-conventional Yeasts. *Front Bioeng. Biotechnol.*, **9**, 1-10. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.765396>
- Shmakov, S., Smargon, A., Scott, D., Cox, D., Pyzocha, N., Yan, W., Abudayyeh, O. O., Gootenberg, J. S., Makarova, K. S., Wolf, Y. I., Severinov, K., Zhang, F. & Koonin, E. V. (2017). Diversity and evolution of class 2 CRISPR-Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*, **15**, 169-182. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.184>
- Smith, A. M. C., Takeuchi, R., Pellenz, S., Davis, L., Maizels, N., Monnat, R. J. & Stoddard, B. L. (2009). Generation of a nicking enzyme that stimulates site-specific gene conversion from the I-Anil LAGLIDADG homing endonuclease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106(13)**, 5099-5104. <https://doi.org/10.1073/pnas.0810588106>
- 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. *ACS Synthetic Biology*, **10(2)**, 297-308. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.0c00426>
- Stadtmayer, E. A., Fraietta, J. A., Davis, M. M., Cohen, A. D., Weber, K. L., Lancaster, E., Mangan, P. A., Kulikovskaya, I., Gupta, M., Chen, F., Tian, L., Gonzalez, V. E., Xu, J., Jung, I. Y., Melenhorst, J. J., Plesa, G., Shea, J., Matlawski, T., Cervini, A., Gaymon, A. L., Desjardins, S., Lamontagne, A., Salas-McKee, J., Fesnak, A., Siegel, D. L., Levine, B. L., Jadowsky, J. K., Young, R. M., Chew, A., Hwang, W.-T., Hexner, E. O., Carreno, B. M., Nobles, C. L., Bushman, F. D., Parker, K. R., Qi, Y., Satpathy, A. T., Chang, H. Y., Zhao, Y., Lacey, S. F. & June, C. H. (2020). CRISPR-engineered T cells in patients with refractory cancer. *Science*, **367(6481)**, 1-12. <https://doi.org/10.1126/science.aba7365>
- Sternberg, S. H. & Doudna, J. A. (2015). Expanding the Biologist's Toolkit with CRISPR-Cas9. *Molecular Cell*, **58(4)**, 568-574. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.02.032>
- Storici, F., Lewis, L. K. & Resnick, M. A. (2001) *In vivo* site-directed mutagenesis using oligonucleotides. *Nature Biotechnology*, **19**, 773-776. <https://doi.org/10.1038/90837>
- Strucko, T., Andersen, N., L. Mahler, M., R. Martinez J., L., Uffe H. & Mortensen, A. (2021) CRISPR/Cas9 method facilitates efficient oligo-mediated gene editing in *Debaryomyces hansenii*. *Synthetic Biology*, **6(1)**, 1-9. <https://doi.org/10.1093/synbio/ysab031>
- Utomo, J. C., Hodgins, C. L. & Ro, D. K. (2021). Multiplex Genome Editing in Yeast by CRISPR/Cas9—A Potent and Agile Tool to Reconstruct Complex Metabolic Pathways. *Frontiers in Plant Science*, **12**, 1-15. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.719148>

- Vriend, L. E. M. & Krawczyk, P. M. (2017). Nick-initiated homologous recombination: Protecting the genome, one strand at a time. *DNA Repair*, **50**, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2016.12.005>
- Vyas, V. K., Barrasa, M. I. & Fink, G. R. (2015). A *Candida albicans* CRISPR system permits genetic engineering of essential genes and gene families. *Science Advances*, **1(3)**, 1-6. doi: 10.1126/sciadv.1500248
- Wach, A., Brachat, A., Pöhlmann, R. & Philippsen, P. (1994). New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **10(13)**, 1793-1808. <https://doi.org/10.1002/yea.320101310>
- Wagner, J.M. & Alper, H. S. (2016). Synthetic biology and molecular genetics in non-conventional yeasts: Current tools and future advances. *Fungal Genetics and Biology*, **89**, 126–136. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.12.001>
- Wang, P. (2018). Two Distinct Approaches for CRISPR-Cas9-Mediated Gene Editing in *Cryptococcus neoformans* and Related Species. *mSphere*, **3(3)**, 1-9. <https://doi.org/10.1128/mspheredirect.00208-18>
- Zaidi, S. SeA., Mahas, A., Vanderschuren, H. & Magdy, M. M. (2020). Engineering crops of the future: CRISPR approaches to develop climate-resilient and disease-resistant plants. *Genome Biology*, **21**, 1-19. <https://doi.org/10.1186/s13059-020-02204-y>
- Zalatan, J. G., Lee, M. E., Almeida, R., Gilbert, L. A., Whitehead, E. H., La Russa, M., Tsai, J. C., Weissman, J. S., Dueber, J. E., Qi, L. S. & Lim, W. A. (2015). Engineering complex synthetic transcriptional programs with CRISPR RNA scaffolds. *Cell*, **160**, 339-350. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.11.052>
- Zetsche, B., Heidenreich, M., Mohanraju, P., Fedorova, I., Kneppers, J., DeGennaro, E. M., Winblad, N., Choudhury, S. R., Abudayyeh, O. O., Gootenberg, J. S., Wu, W. Y., Scott, D. A., Severinov, K., van der Oost, J. & Zhang, F. (2017). Multiplex gene editing by CRISPR–Cpf1 using a single crRNA array. *Nature Biotechnology*, **35(1)**, 31-34. <https://doi.org/10.1038/nbt.3737>
- Zhang, Y., Wu, Y., Wu, Y., Chang, Y. & Liu, M. (2021). CRISPR-Cas systems: From gene scissors to programmable biosensors. *Trends in Analytical Chemistry*, **137**, 1-18. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2021.116210>
- Zheng, Y., Su, T. & Qi, Q. (2019). Microbial CRISPRi and CRISPRa systems for metabolic engineering. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, **24**, 579-591. <https://doi.org/10.1007/s12257-019-0107-5>