

Markus Tuominen

CRISPR-INTERFERENSSI BAKTEERIEN METABOLIAMUOKKAUKSESSA

Biotekniikan koulutusohjelma

Kandidaatintyö

Maaliskuu 2020

TIIVISTELMÄ

TAMPEREEN YLIOPISTO

Biotekniikan koulutusohjelma

Tuominen, Markus: CRISPR-interferenssi bakteerien metaboliamuokkauksessa

Kandidaatintyö

Maaliskuu 2020

Pääaine: Bio- ja ympäristötekniikka

CRISPR-interferenssi on uusi, mutta tiedepiireissä jo paljon huomiota saanut geenien ekspressiosäätelytekniikka. Se perustuu prokaryooteista löydettyyn CRISPR/Cas9-immuunijärjestelmään, jossa ainoastaan yksi proteiini vastaa solussa vieraan DNA:n pilkkomisesta. Nukleaasiaktiivisuuden hiljentävällä mutaatiolla saadaan kuitenkin aikaan proteiini, joka pilkkomisen sijasta estää stereomeerisesti kohde-DNA:n transkription, ja edelleen tarkoituksenmukaisesti käytettäessä geenin hiljenemisen. CRISPR-interferenssi on tarkkuutensa, säädettävyytensä ja palautuvuutensa ansiosta ennennäkemätön geenien ekspressiosäätelytekniikka, jonka on potentiaalinsa vuoksi spekuloitu syrjäyttävän yleisimmät käytössä olevat tekniikat.

Potentiaalisista ominaisuuksistaan huolimatta CRISPR-interferenssin käytännöllisyyttä ei ole vielä vertailtu suhteessa muihin tunnettuihin ekspressiosäätelymenetelmiin. Tässä työssä kootaan julkaistuihin tutkimuksiin pohjautuvaa vertailuaineistoa, jonka avulla pyritään muodostamaan käsitys CRISPR-interferenssin tämänhetkisestä kilpailukykyisyydestä ja valmiudesta teollisten sovellusten työkaluksi. CRISPR-interferenssin on jo osoitettu soveltuvan monenlaisiin käyttötarkoituksiin, mutta riittävän vertailudatan keräämiseksi tässä työssä vertailun painopisteeksi on valittu hiljennystehokkuuden ja spesifisyyden ohella saavutukset bakteerien metaboliamuokkauksissa.

Kerätyn datan perusteella päädyttiin johtopäätökseen, että vaikka CRISPR-interferenssi suoriutuu selkeästi muita säätelytekniikoita paremmin, ei tekniikka silti ole yksiselitteisesti käytännöllisin menetelmä metaboliamuokkaukseen. Tämä johtuu siitä, että eri sovelluksilla voi olla hyvin erilaisia rajoitteita ja prioriteetteja, joihin CRISPR-interferenssi ei pysty aina esimerkiksi kustannustehokkuudeltaan vastaamaan. Metaboliamuokkauksissa CRISPR-interferenssi ei vielä yksinään pärjää yhdistelmätekniikoille, joihin liittyy usein myös geenien deleetioita. On kuitenkin huomionarvoista, että tähänastisissa CRISPR-interferenssin metaboliamuokkaukseen kohdistuvissa tutkimuksissa on usein tavoitteena tuottavuuden maksimoinnin sijasta yleisen soveltuvuuden tarkastelu. CRISPR-interferenssin käytännön potentiaalnin mittaamiseksi tarvitaankin lisätutkimuksia, joiden prioriteettina on tuottavuus ja/tai kannattavuus.

Avainsanat: CRISPR-interferenssi, CRISPR/Cas9, metaboliamuokkaus, geenien ekspressiosäätely

SISÄLLYSLUETTELO

1. JOHDANTO	1
2. CRISPR/CAS9	3
2.1 Alkuperä.....	3
2.2 Funktionaaliset osat	4
2.3 Toimintaperiaate	7
3. CRISPR-INTERFERENSSI	10
3.1 Toimintaperiaate	10
3.2 Säätelymahdollisuudet ja rajoitteet	11
4. VERTAILU MUIHIN GEENIN ILMENTYMISTÄ SÄÄTELEVIIN MENETELMIIN...	15
4.1 Geenien ilmentymisen muokkaamiseen käytettävät menetelmät.....	15
4.1.1 Antisense RNA	15
4.1.2 RNAi	16
4.2 Hiljennystehokkuus	17
4.3 Spesifisyys.....	19
4.4 Sovelluksia.....	21
4.5 Tulosten tulkinta	22
5. YHTEENVETO.....	24
LÄHTEET	25

LYHENTEET JA MERKINNÄT

asRNA	Antisense oligonucleotide. Yksijuosteinen RNA-molekyyli, joka sitoutuu yksijuosteiseen lähetti-RNA:han estäen sen translaation. Tähän viitataan usein myös lyhenteillä AGO tai ASO.
Cas	CRISPR-associated protein. CRISPR-järjestelmän käyttämä proteiini.
CRISPR	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats. DNA-juoste, joka sisältää virusperäistä DNA:ia.
CRISPRi	CRISPR interference. CRISPR/Cas-järjestelmään perustuva geenien ekspression säätelytekniikka.
crRNA	CRISPR-RNA. CRISPR-DNA:sta transkriptoitu RNA-molekyyli, joka sisältää virusperäistä geneettistä tietoa.
DNA	Deoksiribonukleiinihappo. Geneettistä tietoa sisältävä molekyyli.
HNH-domeeni	Endonukleaasidomeeni, joka on nimetty rakenteensa perusteella histidiinin (H) ja asparagiinin (N) mukaan.
LNA	Locked nucleic acid. DNA:n kaltainen rakenne, jonka sokerirungossa on ylimääräinen hiilisilta.
miRNA	MicroRNA. RNAi-tekniikan käyttämä RNA-molekyyli, joka sitoutuu yksijuosteiseen lähetti-RNA:han estäen sen translation.
PAM	Protospacer adjacent motif. Lyhyt nukleotidisekvenssi, jonka avulla Cas-proteiini tunnistaa kohdejuosteen.
RISC	RNA-induced silencing complex. Proteiinikompleksi, joka pilkkoo lähetti-RNA:ta komplementaarisen ohje-RNA:n avulla.
RNA	Ribonukleiinihappo. DNA:n kaltainen rakenne, jonka sokerirungossa deoksiriboosi on korvattu riboosilla.
RNAi	RNA interference. Geenien ekspression säätelytekniikka.
RNAP	RNA-polymeraasi. DNA:n transkriptiosta vastaava entsyymi.
RNAasi H	Ribonukleaasi H. RNA-juosteen hajoamista katalysoiva proteiini.
RuvC	Cas9-proteiinin nukleaasidomeeni, joka kykenee aiheuttamaan katkoksen DNA-juosteeseen.
sgRNA	Small guide RNA. Keinotekoisesti valmistettavissa oleva RNA-molekyyli, jonka avulla Cas-nukleaasit löytävät kohde-DNA:n. Tähän viitataan myös usein lyhenteellä gRNA.

siRNA	Small interfering RNA. RNAi-tekniikan käyttämä RNA-molekyyli, joka sitoutuu yksijuosteiseen lähetti-RNA:han estäen sen translaation.
TALEN	Transcriptor-activator-like effector nuclease. Geenimuokkaustekniikka.
tracrRNA	Trans-activating crRNA. CrRNA:n biogeneesiä avustava hiusneula- maisesti laskostunut RNA-molekyyli.
ZFN	Zinc finger nuclease. Geenimuokkaustekniikka.

1. JOHDANTO

Bakteerit ovat keskeisiä teollisen biotekniikan työkaluja. Ihmisen tavoin bakteerien täytyy selvitäkseen käsitellä molekyylejä anabolisissa ja katabolisissa reaktioissaan, jolloin lähtötuotteet muuttuvat uusiksi yhdisteiksi. (Nealson, 1999) Tutkimuksessa ja teollisuudessa on hyödynnetty tätä ominaisuutta käyttämällä bakteereita eräänlaisina tuotantolinjoina, joissa lähtöaineet muutetaan niiden metaboliassa arvokkaiksi yhdisteiksi, kuten lääkeaineiksi (Magocha *et al.*, 2018). Luonnolliset ja muuntelemattomat mikrobit kuitenkin käyttävät aineenvaihduntareittejään vain sen verran kuin ne tarvitsevat (Hibbing *et al.*, 2010), eivätkä lähtöaineet aina edes prosessoidu juuri halutuiksi yhdisteiksi. Bakteerien tuottavuutta onkin yleensä tarpeellista tehostaa geenimuokkauksella tai -säätelyllä, jonka seurauksena haluttuja aineenvaihduntareittejä aktivoidaan ja epätoivottuja hiljennetään. (Nicolaou *et al.*, 2010; Alper and Avalos, 2018; Wess *et al.*, 2019)

Vaikka geenimuokkausta on harjoitettu ja kehitetty jo useita vuosikymmeniä (Rothstein, 1983; Smithies *et al.*, 1985), ovat tutkijoiden käytössä olevat työkalut ja menetelmät edelleen jokseenkin kalliita, epäkäytännöllisiä ja toiminnallisuudeltaan osittain sattumaankin perustuvia (Osborn, Belanto *et al.*, 2016; Jackson *et al.*, 2003; Osborn, Webber *et al.*, 2016; Pattanayak *et al.*, 2011). Tieteen kehittyminen luo jatkuvasti uusia ja ennennäkemättömiä mahdollisuuksia biologian hyödyntämiselle, mikä taas lisää tarvetta tehokkaampien geenitekniisten työkalujen kehittämiseksi. Yksi potentiaalinen ratkaisu on uusi CRISPR/Cas9 -tekniikka (Jinek *et al.*, 2013). CRISPR/Cas9:stä johdetuista sovelluksista povataan jopa uutta geenikäsittelyn aikakautta, joka voi tehokkuudellaan antaa mahdollisuuksia vallankumoukselliseen biologian mikrotason rakennuspalikoiden hallitsemiseen aina aineenvaihdunnan muokkaamisesta geneettisten sairauksien parantamiseen (Kleinstiver *et al.*, 2016; Das *et al.*, 2019). Potentiaalistaan huolimatta CRISPR:n käytännöllisyys suhteessa muihin geenienkäsittelymenetelmiin on vielä perusteellisesti määrittelemättä, minkä vuoksi tässä työssä vertaillaan menetelmiä keskenään aiempien tutkimustulosten perusteella.

Luvussa 2 tarkastellaan CRISPR/Cas9-tekniikkaa ja sitä, miten se on antanut tiedemiehille ainutlaatuista potentiaalia tarkkaan ja tehokkaaseen geenien käsittelyyn. Luvussa 3 tutustutaan edellä mainitusta tekniikasta johdettuun CRISPR-interferenssi-sovellukseen.

Luvussa 4 käydään ensin läpi yleisimpien geenimuokkausmenetelmien toimintaperiaatteet, heikkoudet ja vahvuudet, minkä jälkeen näitä ominaisuuksia verrataan CRISPR-interferenssiin. Lopuksi kootaan yhteenveto ja päätelmät CRISPR-interferenssin asemasta geenisäätelytyökaluna.

2. CRISPR/CAS9

2.1 Alkuperä

CRISPR on prokaryooteista löydetty luontainen immuunijärjestelmä viruksia vastaan. Vaikka tämän immuunijärjestelmän löytämisestä on kulunut jo yli 30 vuotta, on sen biologisen merkityksen ymmärtäminen vaatinut paljon spekulatiota, hypoteeseja sekä tutkimuksia. Alun perin ensimmäinen vihje CRISPR:n olemassaolosta perustuikin puhtaasti sattumaan (Ishino *et al.*, 1987). Teknologian kehittymisen myötä genomien sekvensoimisesta alkoi tulla yhä helpompaa, minkä johdosta yhä useampi tutkimusryhmä havaitsi eri mikrobilajikkeiden kantavan saman tyyppisiä DNA-toistorakenteita. Biologiselta merkitykseltään tuntematon CRISPR-rakenne on ennen saanut useita nimityksiä eri tutkimusryhmiltä, kuten "short regularly spaced repeats" (SRSR) (Mojica *et al.*, 1993), "spacers interspersed direct repeats" (SPIDR) (Jansen *et al.*, 2002) ja "large cluster of tandem repeats" (LCTR) (She *et al.*, 2001). Lopulta vuonna 2002 tehdyn aloitteen seurauksena CRISPR vakiintui tiedepiireissä neuvottelujen jälkeen DNA-rakenteen yhteiseksi nimitykseksi (Ishino *et al.*, 2018).

CRISPR-rakenne löydettiin ensimmäistä kertaa tietoisesti vuonna 1987, kun Ishino *et al.* tutkivat *E. coli* *iap*-geenin sekvensointia (Ishino *et al.*, 2018). Sekvensoinnin seurauksena heidän huomionsa kiinnittyi kuitenkin tuntemattomaan DNA-rakenteeseen, jossa 32 nukleotidin välein toistui viisi lähes identtistä 29 nukleotidin sekvenssiä. Tutkimusryhmä ei kuitenkaan osannut vielä sen aikaisilla tiedoilla määrittellä CRISPR:n biologista merkitystä, sillä vastaavia DNA-toistojaksvoja ei löytynyt olemassa olevista tietokannoista. (Ishino *et al.*, 1987)

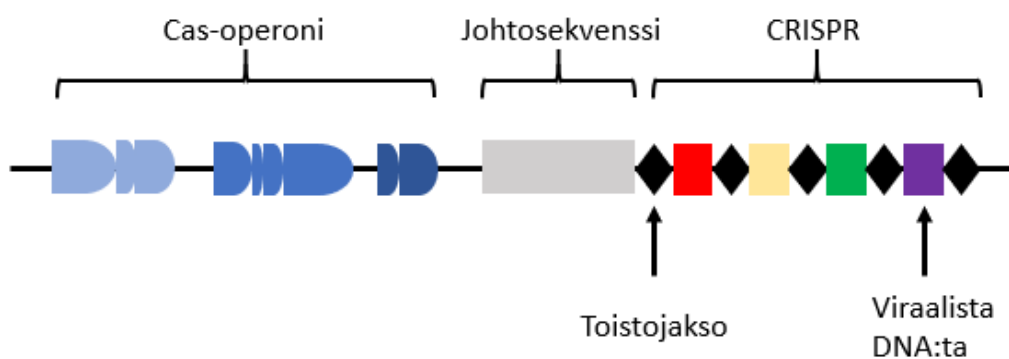
Vuonna 1993 Francisco Mojica kollegoineen löysi samanlaisen toistojaksorakenteen, CRISPR:n, ensimmäistä kertaa myös arkeonista, kun he tutkivat *Haloferox mediterranein* genomia (Mojica *et al.*, 1993). Löytö oli merkittävä, sillä CRISPR:n ilmeneminen kahdessa eri eliökunnan domeenissa antoi tiedemiehille viitteitä siitä, että kyseisellä DNA-rakenteella luultavasti on mikrobien biologian kannalta jokin keskeinen rooli (Ishino *et al.*, 2018).

CRISPR:n todellinen biologinen tarkoitus alkoi kuitenkin selvitä vuonna 2005, kun Mojica *et al.* sekä Pourcel *et al.* huomasivat tutkimuksissaan, että CRISPR-välikkeiden DNA-

sekvenssit täsmäsivät tunnettujen bakteriofagien sekvenssien kanssa (Mojica *et al.*, 2005; Pourcel *et al.*, 2005). Lisäksi ilmeni, että bakteriofagien DNA:ta CRISPR-rakenteessaan omaavat prokaryootit ovat vastustuskykyisiä kyseisten bakteriofagien infektiolle. Näiden löytöjen pohjalta he päättelivät, että CRISPR-jaksot toimivat osana jonkinlaista prokaryoottien immuunijärjestelmää, jossa vieras DNA säilötään CRISPR-rakenteeseen eräänlaiseksi solun muistiksi aikaisemmista infektiosta. (Ishino *et al.*, 2018) Tämä teoria todistettiin kokeellisesti paikkansa pitäväksi vuonna 2007 (Barrangou *et al.*, 2007).

2.2 Funktionaaliset osat

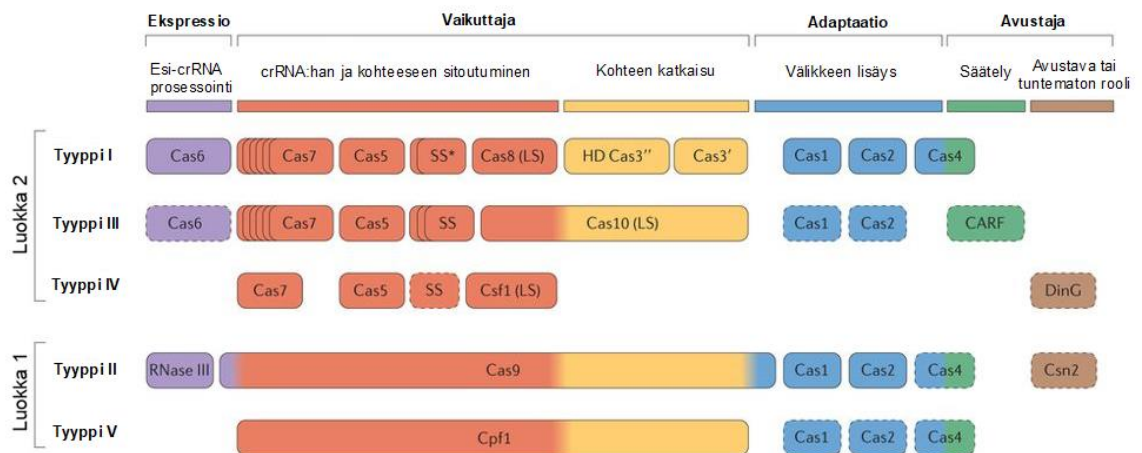
CRISPR-järjestelmiä on rakenteeltaan monenlaisia, mutta niiden kaikkien toiminnan perusedellytyksenä on yksi tai useampi geenijoukko eli CRISPR/cas-lokus, joka koostuu pääasiassa Cas-operonista (CRISPR associated), johtosekvenssistä sekä varsinaisesta CRISPR-alueesta (eng. "CRISPR-array") (kuva 1) (Makarova *et al.*, 2015). CRISPR on pitkä DNA-kaksoisjuoste, jonka tehtävänä on toimia varastona vieraalta faagilta kerätylle DNA:lle. Sen rakenteessa vuorottelevat sekvensseiltään homologiset, toistuvat nukleotidisekvenssit sekä niiden väliin jäävät yksilölliset alueet, joita kutsutaan välikkeiksi (eng. "spacer"). Nämä välikkeet sisältävät bakteerin jo aiemmin infektoiden faagien DNA:ta, jonka avulla cas-proteiinit kykenevät jatkossa torjumaan samojen faagien infektiopyrkimyksiä. Toistosekvenssien pituudet ovat tyypillisesti 21–48 nukleotidia, kun taas viraalisten välikkeiden pituudet ovat noin 26–72 nukleotidia. (Rath *et al.*, 2015)



Kuva 1. *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) -järjestelmien toiminnalle välttämättömät geenit ja niiden järjestäytyminen CRISPR-lokuksessa. Muokattu lähteestä (Mojica and Garrett, 2013)*

Cas-nukleaaasit vastaavat infektiotilanteessa varsinaisen immunitetin aiheuttamasta väliintulosta. Näiden proteiinien sekä niitä ilmentävien geenien lisäksi järjestelmän kokonaisvaltaiselle toimivuudelle ovat välttämättömiä CRISPR-toistojaksoista valmistetut

crRNA-molekyylit (CRISPR-RNA), jotka ohjaavat Cas-nukleaasien toimintaa. Erilaisia järjestelmälle ominaisia proteiiniluokkia on tunnistettu jo useita kymmeniä, ja ne jaetaan toiminnallisuutensa perusteella adaptaatio-, vaikuttaja-, ekspressio- ja avustajaproteiineihin (kuva 2). Adaptaatioproteiinit vastaavat uuden, viraalisen geneettisen materiaalin tunnistamisesta ja liittämistä DNA:na CRISPR-lokukseen. Ekspressioproteiinit jalostavat esi-crRNA:n valmiiksi crRNA:ksi ja edesauttavat nukleaasikompleksin sitoutumista kohteeseensa. Vaikuttajaproteiinit puolestaan hyödyntävät valmistettua crRNA:ta löytääkseen solusta faagien geneettistä materiaalia ja pilkkoakseen sen. Avustajaproteiineiksi kutsutaan CRISPR/Cas-järjestelmän tapauksessa niiden proteiinien joukkoa, jotka ovat harvinaisia, toiminnaltaan yksilöllisiä tai joiden funktiota ei vielä tunneta. Spekuloituja avustajaproteiineihin liittyviä toimintoja ovat muun muassa CRISPR/Cas-kytköksi- nen apoptoosi, CRISPR/Cas-järjestelmän aktiivisuuden säätely ja CRISPR-integraatio- prosessin turvaaminen. (Makarova *et al.*, 2011; Makarova *et al.*, 2013; Makarova *et al.*, 2015)



Kuva 2. Yleisimmät tunnetut CRISPR-associated (Cas) -proteiinit ja niiden luokittelu neljään toiminnalliseen rooliin CRISPR-järjestelmätyypeittäin. Katkoviivalla ympyröidyt proteiinit eivät ole kyseisen järjestelmätyypin toiminnan kannalta välttämättömiä. Muokattu lähteestä (Makarova *et al.*, 2015)

Cas-proteiineja ilmentää joukko genejä, joista käytetään yhteisesti nimitystä Cas-operoni. Nämä geenit sijaitsevat CRISPR-lokuksen läheisyydessä ennen johtosekvenssiä lukuun ottamatta joitakin poikkeuksia, kuten avustajaproteiinien genejä. Cas-operonin sisältämät geenit vaihtelevat käytössä olevan CRISPR/Cas-järjestelmätyypin perusteella, mutta yleisimmät ja lähes kaikissa järjestelmissä esiintyvät proteiinit ovat Cas1, Cas2 ja Cas4. (Yosef *et al.*, 2012; Garrett *et al.*, 2011; Makarova *et al.*, 2011) Merkittäviä yksittäisten järjestelmien tunnusomaisia proteiineja ovat Cas3 tyyppille I, Cas9 tyyppille II

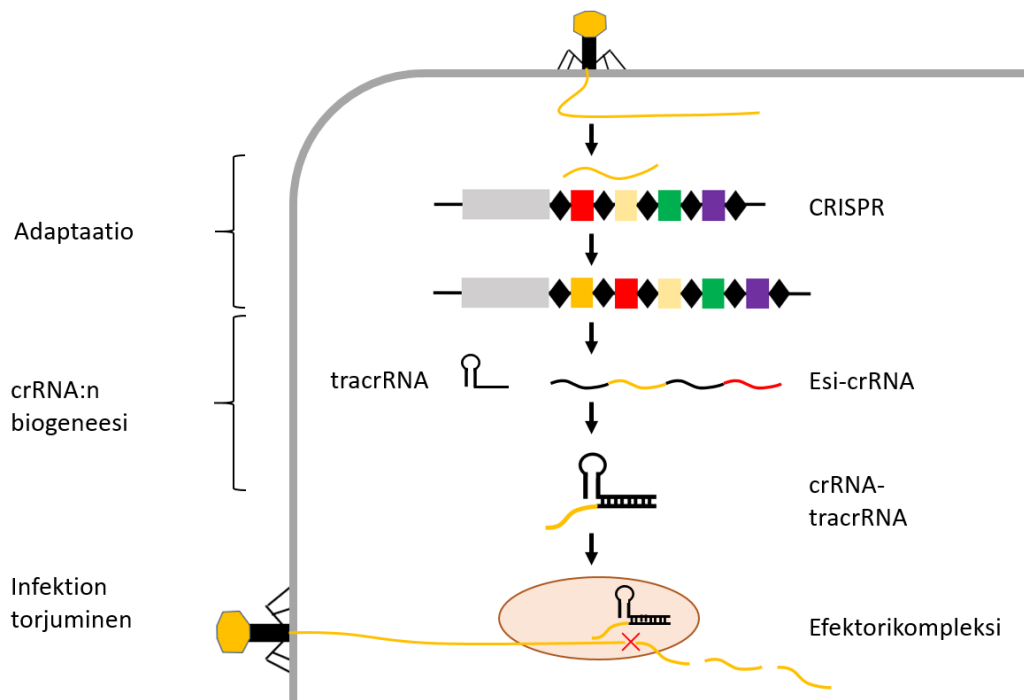
ja Cas10 tyyppille III. (Karimi *et al.*, 2018) Monet Cas-proteiinit toimivat yhteistyössä muodostaen proteiinikomplekseja, joihin viitataan tyyppin I järjestelmissä kaskadeilla ja tyyppien III-A ja III-B järjestelmissä lyhenteillä Csm ja Cmr. (Brouns *et al.*, 2008; Makarova *et al.*, 2015).

Johtosekvenssi (eng. "leader sequence") on CRISPR-rakenteen ja Cas-operonin väliin jäävä noin 100–500 nukleotidin pituinen alue (Alkhnbashi *et al.*, 2016), joka voidaan jakaa ydin- ja pidennysosaan. Suurin osa johtosekvenssistä on harvoin täysin homologista eri mikrobisukujen CRISPR/Cas-järjestelmien välillä, mutta välittömästi CRISPR-lokukseen vieressä sijaitseva johtosekvenssin ydinosa on säilynyt samanlaisena kaukaisempaakin sukua olevien lajien välillä. (Shah and Garrett, 2011; Lillestøl *et al.*, 2009; Alkhnbashi *et al.*, 2016) Johtosekvenssi toimii CRISPR-järjestelmissä transkriptiopromootorina (Brouns *et al.*, 2008; Lillestøl *et al.*, 2009), minkä lisäksi sillä on osoitettu olevan keskeinen rooli CRISPR/Cas-järjestelmän adaptaatiovaiheen kannalta (Díez-Villaseñor *et al.*, 2013; Erdmann and Garrett, 2012; Yosef *et al.*, 2012). Erinäiset testit viittaavat siihen, että johtosekvenssin puuttuminen johtaa infektiotilanteessa virusperäisen DNA:n insertoinnin häiriintymiseen (Yosef *et al.*, 2012; Erdmann and Garrett, 2012; Garrett *et al.*, 2015), mikä saattaa myös olla CRISPR:lle immuunien faagien keskeinen selviämiskeino (Alkhnbashi *et al.*, 2016). CRISPR-järjestelmien on kuitenkin osoitettu toimivan myös osittain ilman johtosekvenssiä, mikäli CRISPR-rakenne sisältää jo entuudestaan hyökkäävän faagin DNA:ta. Tämä johtuu oletettavasti siitä, että satunnaisesti CRISPR-toistojaksoon päätyneet promootorit huolehtivat transkription käynnistämisestä, mikä on edellytyksenä immuniteetin aiheuttavien Cas-nukleaasien toiminnalle. (Deng *et al.*, 2012; Wurtzel *et al.*, 2010)

CRISPR/Cas-järjestelmät hyödyntävät toiminnassaan lisäksi yksilöllisiä RNA-molekyylejä, joista tunnetuimmat ovat crRNA (CRISPR RNA), esi-crRNA ja tracrRNA (trans-activating crRNA). CrRNA on tietyn CRISPR-välikkeen nukleotidisekvenssiä jäljittelevä RNA-molekyyli, johon on myös liittynenä pieniä osia toistosekvenssiä (Mojica and Garrett, 2013). crRNA on CRISPR/Cas -järjestelmien toiminnan kannalta keskeinen RNA-molekyyli, sillä se tietävästi ohjaa kaikkien järjestelmätyyppien nukleaasien toimintaa. Esi-crRNA on puolestaan pitkä, useita toistojaksoja ja välikkeitä sisältävä esiaste, joka transkriptoidaan CRISPR:stä ja prosessoidaan lopulta valmiiksi crRNA-molekyyliksi (Lundgren *et al.*, 2015). Tyyppin II järjestelmissä esiintyy lisäksi harvinaisempi, erillisestä geenistään ilmennetty tracrRNA, joka osallistuu esi-crRNA:n käsittelyyn ja proteiinikompleksin muodostamiseen (Bikard and Marraffini, 2013).

2.3 Toimintaperiaate

Tunnetut CRISPR-järjestelmät on luokiteltu ominaisuuksiensa perusteella kahteen pääluokkaan, kuuteen tyyppiin ja useisiin kymmeneen alatyyppeihin, joiden määrä kasvaa jatkuvasti uusien tutkimusten myötä. Luokan 1 järjestelmät käyttävät geneettisen materiaalin hajottamiseen useasta proteiinista koostuvia komplekseja, kun taas luokan 2 järjestelmät käyttävät suuria, yhden proteiinin monidomeenisia vaikuttajia, kuten Cas9:ää. (Koonin *et al.*, 2017; Makarova *et al.*, 2018) Tämä käytössä oleva yleinen luokitteluperuste ei ole vielä aivan yksiselitteinen, sillä CRISPR:n levinneisyys, Cas-proteiinien suuri valikoima ja Cas-geenien jatkuva muuntelu ovat luoneet edellytykset suurelle kirjolle uniikkeja CRISPR-järjestelmiä, joita kaikkia ei ole vielä löydetty ja joiden yksityiskohtaiset toimintaperiaatteet eivät ole vielä täysin selvillä. (Lundgren *et al.*, 2015; Karvelis *et al.*, 2013) Kaikista CRISPR-järjestelmistä voidaan kuitenkin tunnistaa kolme yhteistä toimintavaihetta, jotka ovat adaptaatio eli virusperäisen DNA:n integraatio CRISPR:iin, ekspressiovaihe ja infektion torjuminen (kuva 3). (Lundgren *et al.*, 2015).



Kuva 3. CRISPR-järjestelmien yleinen toimintaperiaate. Adaptaatiovaihetta ei tapahdu, mikäli infektoivan viruksen geneettistä materiaalia löytyy jo entuudestaan CRISPR-rakenteesta. Muokattu lähteestä (Wright *et al.*, 2016)

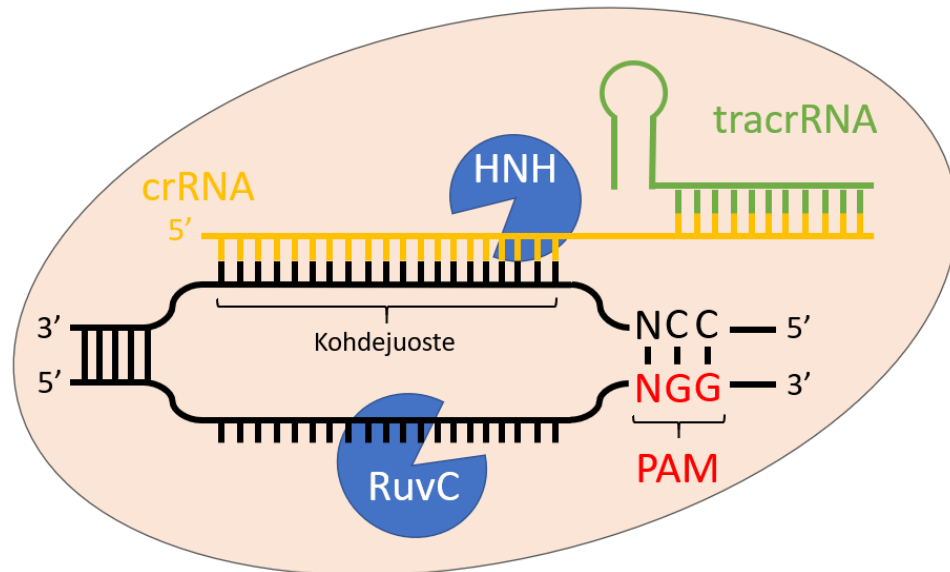
Adaptaatiovaiheessa on kyse tilanteesta, jossa solun CRISPR/Cas -järjestelmä pyrkii mukautumaan uudenlaista infektiota vastaan integroimalla viruksen DNA:ta CRISPR-lokukseen. Adaptaatiovaiheen tarkka toimintaperiaate on vielä enimmäkseen tuntematon, mutta tämänhetkisten tietojen perusteella arvellaan, että integroitavat kaksoisjuosteiset

välikepalat saavat alkunsa faagin replikaatiota seuraavista geneettisen materiaalin sattunnaisista pilkkoutumisista (Marintcheva, 2018). Pelkkä faagien geneettisen aineksen sattumaan perustuva pilkkoutuminen ei riitä, vaan CRISPR/Cas -järjestelmän tehokkuuden kannalta on välttämätöntä, että faagin geneettistä materiaalia saadaan integroitua solun CRISPR-lokukseen infektion torjumista varten. Adaptaatiovaihe alkaa Cas1-Cas2-kompleksin sitoutuessa kaksijuosteiseen integroitavaan välikkeeseen, minkä jälkeen se aiheuttaa CRISPR-rakenteen ensimmäisen, siis johtosekvenssin vieressä olevan kaksoisjuosteisen toistosekvenssin jakautumisen kahteen yksijuosteiseen osaan. Integroitavan välikkeen 3'-päät sitoutuvat kummankin yksijuosteisen toistosekvenssin 5'-päähän, minkä jälkeen isäntäsolun DNA-polymeraasit korjaavat nämä toistosekvenssit kaksijuosteisiksi. Lopputuloksena on yhden toisto- ja välikesekvenssin verran pidennetty CRISPR-lokus, jonka tuorein integroitu välike sijaitsee lähimpänä johtosekvenssiä. (McGinn and Marraffini, 2019)

Ekspressiovaihe eli crRNA:n biogeneesi alkaa CRISPR-DNA:n transkriptiolla pitkäjuosteiseksi esi-crRNA:ksi, joka sisältää sekä toistosekvenssit että välikkeet. Tyypin II järjestelmille on ominaista, että esi-crRNA:n lisäksi transkriptoidaan myös erillisestä, cas-opeonin vieressä sijaitsevasta geenistä tracrRNA:ta. Toistosekvenssien kanssa homologi-nen tracrRNA pariutuu yksitellen jokaisen esi-crRNA:n toistojakson kanssa muodostaen kaksoisjuosteen, jonka RNAasi (ribonukleaasi) III katkaisee toistosekvenssin kohdalta yhdessä Cas9-proteiinin avustuksella. Tämän prosessin seurauksena uniikit crRNA-sekvenssit saadaan eroteltua CRISPR-rakenteesta erillisiksi juosteiksi, jotka koostuvat 20 nukleotidia pitkästä viraalisesta DNA:sta, 19–22 nukleotidia pitkästä toistojaksojen DNA:sta sekä tracrRNA:sta, joka on sitoutunut komplementaarisesti crRNA:n toistojakso-osaan. (Deltcheva *et al.*, 2011; Jinek *et al.*, 2012)

Tyypin II CRISPR-järjestelmissä infektion torjumisesta vastaa ainoastaan yksi proteiini, Cas9. Se on nukleaasi, joka sisältää DNA:n katkaisemiseen kykenevät domeenit HNH ja RuvC (Sapranauskas *et al.*, 2011). Toiminnallinen efektorikompleksi (kuva 4) muodostuu, kun ekspressiovaiheessa valmistunut crRNA-tracrRNA-juoste sitoutuu Cas9-nukleaasiin, jossa se toimii mallina kohde-DNA:n tunnistamiselle (Jinek *et al.*, 2012). Cas9 ei kuitenkaan kykene katkaisemaan mitä tahansa DNA-juostetta, vaan se vaatii katkaisu-tavan juosteen läheisyydestä oikeanlaisen kolmen nukleotidin mittaisen PAM-tunnistus-sekvenssin (Protospacer adjacent motif). Eri CRISPR-järjestelmätyyppien Cas-proteiinit vaativat kukin toimiakseen omanlaisensa PAM-emäsjärjestykset. Cas9:n tapauksessa vaadittu PAM-sekvenssi on 5'-NGG-3', jossa N on mikä tahansa emäs joukosta guaniini,

adeniini, sytosiini ja tyymiini. PAM-sekvenssi sijaitsee kohde-DNA:n vastinjuosteessa katkaisukohdan välittömässä läheisyydessä. (Anders *et al.*, 2014)



Kuva 4. Efektorikompleksi ja kohde-DNA:n tunnistaminen. Cas9:n, crRNA:n ja tracrRNA:n muodostama efektorikompleksi sitoutuu PAM-sekvenssin tunnistamisen jälkeen kaksoisjuosteiseen DNA:han ja erottaa vastinjuosteet toisistaan. Kohdejuosteen ja crRNA:n pariutuessa komplementaaraisesti HNH- ja RuvC-domeenit katkaisevat kummankin DNA-juosteen kolmen nukleotidin etäisyydeltä PAM-sekvenssistä. Muokattu lähteestä (Dickinson and Goldstein, 2016)

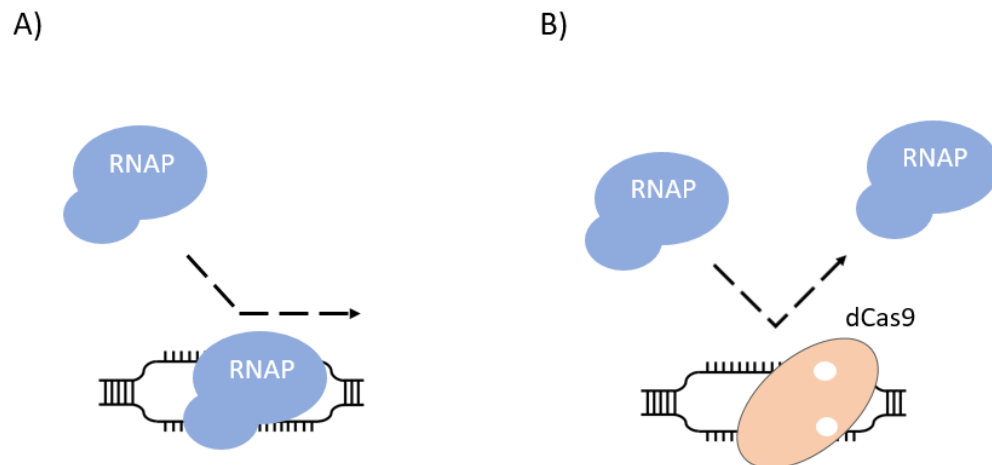
Oikeanlaisen kohde-DNA:n katkaiseminen on tarkasti säädeltyä: PAM-sekvenssin tunnistaminen johtaa kohde-DNA:n vastinjuosteiden erkanemiseen toisistaan, minkä jälkeen efektorikompleksin crRNA pyrkii pariutumaan PAM-juostetta vastakkaisen juosteen kanssa. (Sternberg *et al.*, 2014) PAM-sekvenssin lisäksi kohteen tunnistaminen edellyttää komplementaarisuutta kohdejuosteen ja crRNA:n välillä, sillä nukleotidien pariutumiset edesauttavat kasautuvasti HNH-domeenin konformaation muutosta. Tietyn komplementaarisuusasteen ylittyessä konformaation muutos johtaa lopulta HNH- ja RuvC-domeenien aktivoitumiseen (Sternberg *et al.*, 2015), jolloin HNH katkaisee crRNA:n kanssa pariutuneen kohdejuosteen ja RuvC puolestaan sen vastinjuosteen (Dickinson and Goldstein, 2016). Kummankin juosteen tapauksessa katkaisu tapahtuu 3 nukleotidin etäisyydeltä PAM-sekvenssistä (Gasiunas *et al.*, 2012).

3. CRISPR-INTERFERENSSI

3.1 Toimintaperiaate

CRISPRi (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats interference) on prokaryoottien CRISPR/Cas9-immuunijärjestelmästä johdettu geenisäätelytekniikka. Kyseessä on työkalu, jonka avulla kyetään säätämään hallitusti geenien ekspressiota niin prokaryootti-, eukaryootti- kuin nisäkässoluissakin. (Qi *et al.*, 2013) Esimerkiksi teollisessa biotekniikassa tällaiselle tekniikalle on helppo keksiä lukuisia potentiaalisia käyttökohteita, kuten teollisten mikrobien aineenvaihdunnan optimointi (Kim *et al.*, 2017; Cleto *et al.*, 2016; Higo *et al.*, 2018; Huang *et al.*, 2016; Gordon *et al.*, 2016; Park *et al.*, 2018; Woolston *et al.*, 2018; Sung *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2016). Huolellinen aineenvaihdunnan muokkaus voi kuitenkin edellyttää jopa useihin eri geeneihin vaikuttamista, jolloin isäntäsolun tärkeimpiin geeneihin kohdistuvat tarkoitukselliset tai tahattomat deleetiot voivat johtaa solun kuolemaan. CRISPRi kykenee säätämään usean geenin ekspressiota samanaikaisesti yhden ainoan plasmidin avulla ja ilman isäntägenomin muokkaamista, mikä säästää paljon aikaa ja työtä suhteessa kankeisiin ja arvaamattomiin geenimuokkausmenetelmiin. (Lv *et al.*, 2015)

CRISPRi:n toiminta perustuu lähes identtisesti CRISPR/Cas9-järjestelmään, ja niiden erona on ainoastaan efektorikompleksin käyttämän proteiinin rakenne. CRISPRi:n tapauksessa käytetään Cas9-proteiinia, johon on kohdistettu pistemutaatiot HNH- ja RuvC-nukleasidomeeneihin. Tätä mutanttiproteiinia kutsutaan nimellä dCas9 (dead CRISPR-associated protein 9). (Qi *et al.*, 2013) Mutaation seurauksena proteiini menettää kykynsä katkoa DNA:ta (Jinek *et al.*, 2012), mutta pystyy edelleen ohje-RNA:n avulla tunnistamaan DNA:ta ja sitoutumaan siihen. Kohde-DNA:han sitoutunut dCas9 estää stereomeerisesti lähetti-RNA:n transkriptiosta vastaavan RNAP:n (RNA-polymeraasi) sitoutumisen (kuva 5), minkä seurauksena kohde-DNA:n ilmentäminen estyy.



Kuva 5. Transkription estäminen dCas9-proteiinin avulla. A) Transkription alkaminen normaalisti: RNA-polymeraasi (RNAP) kiinnittyy DNA:han, erottaa vastinjuosteet toisistaan ja aloittaa lähetti-RNA:n valmistamisen. RNAP etenee juostetta pitkin, kunnes lähetti-RNA on valmis. B) CRISPRi:n vaikutus transkriptioon: dCas9 kiinnittyy kohde-DNA:han, jolloin se estää stereomeerisesti RNAP:n toimintaa ja edelleen geenin ilmentämistä. Muokattu lähteestä (Qi et al., 2013)

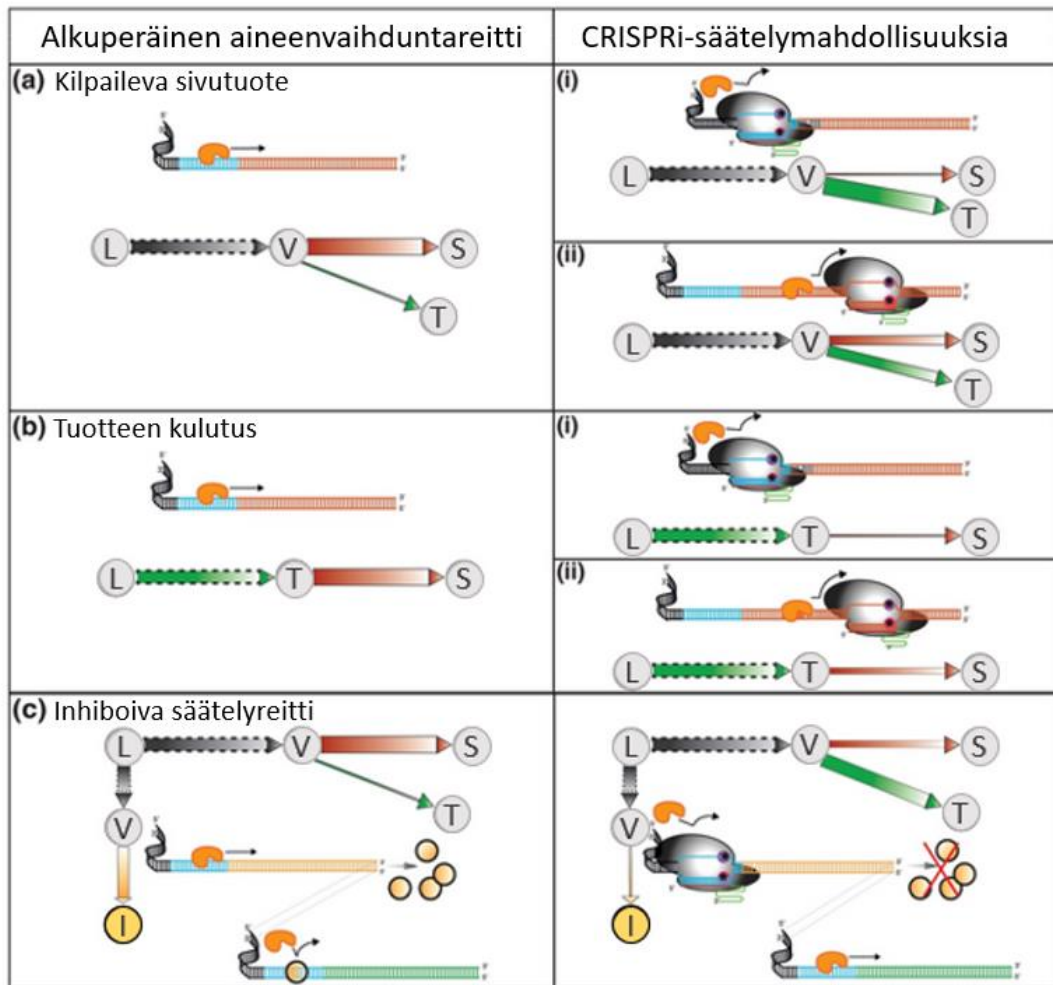
CRISPRi:n tapauksessa dCas9:n käyttämä ohje-RNA eli crRNA-tracrRNA-kompleksi on mahdollista korvata yksijuosteisella sgRNA:lla (small guide RNA), joka voidaan syntetisoida keinotekoisesti suoraan dCas9:n käytettäväksi ilman tarvetta crRNA:n biogeneesivaiheelle ja tracrRNA:n transkriptiolle. Toiminnallinen sgRNA sisältää crRNA:n tavoin 20 nukleotidia pitkän kohde-DNA:n tunnistamisesta vastaavan osan sekä hiusneulamaisen, crRNA-tracrRNA-pariutumiskohtaa jäljittelevän osan, joka mahdollistaa sgRNA:n sitoutumisen dCas9:ään. (Jinek et al., 2012; Qi et al., 2013)

3.2 Säätelymahdollisuudet ja rajoitteet

CRISPRi on ennen kaikkea menetelmä, joka mahdollistaa geenien ilmenemisen hallitun säätämisen tietylle tasolle palautuvasti. CRISPRi:n aiheuttama geenien hiljennystehokkuus riippuu siitä, mihin kohtaan genomia dCas9 sitoutuu. Geenien hiljentäminen tyypillisesti tehostuu, mitä lähempänä promoottoria sitoutuminen tapahtuu. Promoottorialueelle sitoutumisessa on kyse transkription aloitusvaiheen estämisestä, mikä vaikuttaisi olevan tehokkain tapa hiljentää geeni CRISPRi:n avulla. Sitoutuminen kauemmas geenin promoottorialueesta aiheuttaa sen sijaan transkription pidennysvaiheen häiriintymistä, kun dCas9 estää jo valmisteilla olevan lähetti-RNA:n valmistumista. Yleisesti ottaen ekspression hiljeneminen on kuitenkin sitä vaimeampaa, mitä kauemmas geenin promoottoria dCas9 sitoutuu. Promoottorialueen ulkopuolelle sitoutumisessa geenien hiljenemistehokkuuteen vaikuttaa lisäksi se, sitoutuuko dCas9 koodaavaan juosteeseen

vai mallijuosteeseen. Sitoutuminen koodaavaan juosteeseen johtaa tyypillisesti tehokkaampaan transkription hiljentämiseen kuin sitoutuminen mallijuosteeseen. (Qi *et al.*, 2013; Bikard and Marraffini, 2013)

Teollisen biotekniikan kannalta on tärkeää, että solupopulaatioiden tuottavuutta saadaan tehostettua optimoimalla aineenvaihduntaa. Aineenvaihduntareittejä on kuitenkin monenlaisia, ja ne voivat vähentää tavoitellun metaboliatuotteen määrää esimerkiksi kilpailemalla samasta lähtöaineesta tai käyttämällä haluttua metaboliatuotetta lähtöaineenään. Jopa haitallisesti tuottavuuteen vaikuttavien aineenvaihduntareittien liian vahva hiljentäminen esimerkiksi deleetioiden seurauksena saattaa kuitenkin tehdä solun täysin toimintakyvyttömäksi. CRISPRi on tässäkin tapauksessa hyödyllinen työkalu, sillä lähes kaikissa tapauksissa dCas9 voidaan ohjata sitoutumaan joko promoottorialueeseen täydellisen hiljenemisen saavuttamiseksi tai vaihtoehtoisesti promoottorialueen ulkopuolelle optimaalisen hiljenemisen saavuttamiseksi (Kuva 6). (Mougiakos *et al.*, 2018)



Kuva 6. Lähestymistapoja aineenvaihduntareittien optimointiin CRISPRi:n avulla. Merkinnot: L: lähtöaine; V: välituote; S: sivutuote; T: tavoiteltu lopputuote; I: inhibiiva säätelyelementti. Nuolien paksuudet kuvaavat materiaalivirtojen suuruuksia. **a)** Sivutuote kilpailee samasta lähtöaineesta halutun tuotteen kanssa. Materiaalivirtaa voidaan muuttaa kohti haluttua tuotetta joko (i) vahvasti ohjaamalla dCas9 geenin promoottoriin tai (ii) hallitusti ohjaamalla dCas9 koodaavaan alueeseen. **b)** Epätoivottu sivutuote käyttää haluttua tuotetta lähtöaineenaan. Sivutuotteeseen johtava aineenvaihduntareitti voidaan joko (i) sammuttaa ohjaamalla dCas9 geenin promoottoriin tai (ii) vaimentaa ohjaamalla dCas9 koodaavaan alueeseen. **c)** Solun aineenvaihduntareitti inhiboi halutun tuotteen synteesiä. Halutun tuotteen materiaalivirtaa saadaan kasvatettua välillisesti ohjaamalla dCas9 inhiboivan geenin promoottoriin. (Mougiakos et al., 2018)

Halutunlaisen sekvenssin omaavaa sgRNA:ta sekä dCas9-nukleaasia voidaan ilmentää kohdesolussa esimerkiksi geenimuokatun plasmidin avulla. Sisällyttämällä plasmidiin useita erilaisia sgRNA-geenejä voidaan dCas9-nukleaasit ohjata hiljentämään useita eri kohdegeenejä samanaikaisesti. (Lv et al., 2015) Plasmidin geenien transkriptio voidaan lisäksi tehdä jostain tietyistä indusoivasta molekyylistä riippuvaiseksi, minkä ansiosta tämä jo entuudestaan poikkeuksellisella tarkkuudella toimiva geenisäätelyprosessi saadaan lisäksi aktivoitua tai hiljennettyä systemaattisesti vaikuttamalla ympäristön olosuhteisiin. Kohdegeenien hiljentäminen käynnistyy vasta sen jälkeen, kun CRISPRi-geenit

sisältävän plasmidivektorin transkriptiota indusoivaa ainetta lisätään solupopulaatioon. Vastaavasti indusoivan aineen poistamisen jälkeen kohdegeenien hiljeneminen alkaa vaimentua, kunnes ekspressio lopulta asettuu alkuperäiselle tasolle. Tämä osoittaa ennen kaikkea sen, että CRISPRi-geenisäätelytekniikka on vaikutuksiltaan palautuva, eikä kohdegeeneihin tarvitse tehdä pysyviä muutoksia. (Qi *et al.*, 2013)

4. VERTAILU MUIHIN GEENIN ILMENTYMISTÄ SÄÄTELEVIIN MENETELMIIN

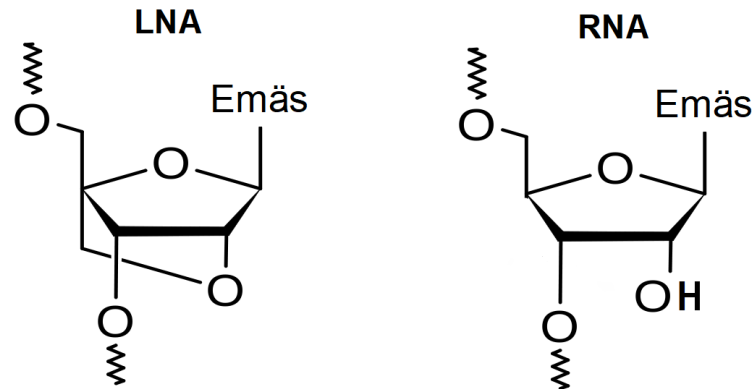
4.1 Geenien ilmentymisen muokkaamiseen käytettävät menetelmät

Tässä osiossa vertaillaan CRISPRi:n ominaisuuksia muihin menetelmiin, joilla kyetään säätelemään geenien ilmentämistä ilman tarvetta genomien muokkaamiselle. CRISPRi:n lisäksi myös TALEN (Transcription-activator-like effector nuclease) (Sanjana *et al.*, 2012; Politz *et al.*, 2013) ja ZFN (Zinc finger nuclease) (Ecco *et al.*, 2017; Beerli *et al.*, 1998) ovat nukleaaseja hyödyntäviä geenimuokaussovelluksia. Ne eivät kuitenkaan kykene CRISPRi:n tavoin vaikuttamaan useaan geeniin samanaikaisesti, minkä lisäksi jokaista kohdegeeniä varten on suunniteltava yksilölliset nukleaasit (Fokum *et al.*, 2019). TALEN- ja ZFN-tekniikoiden metaboliamuokkaustutkimuksien vähäisen otannan vuoksi kyseiset menetelmät sivuutetaan tässä vertailussa, ja CRISPRi:n vertailukohteina käytetäänkin AsRNA:ta (Antisense RNA) ja RNAi:ta (RNA-interferenssi).

4.1.1 Antisense RNA

AsRNA on ei-koodaavaa yksijuosteista RNA:ta, jonka tehtävänä on säädellä geenien ekspressiota. AsRNA-molekyylit syntetisoidaan usein säätelytarkoituksessa samaan aikaan jonkin toisen geenin kanssa. AsRNA:t voidaan luokitella koon perusteella lyhyen (<200 nukleotidia) tai pitkään (>200 nukleotidia) juosteeseen, ja jälkimmäisessä tapauksessa puhutaan tällöin lncRNA:sta (long non-coding RNA). (Pelechano and Steinmetz, 2013) Antisense RNA:ta on löydetty luonnollisissa olosuhteissa kaikista kolmesta eliökunnan domeenista, mikä antaa mahdollisuuksia sen hyödyntämiselle esimerkiksi bioteknisesti potentiaalisissa prokaryooteissa. (Brantl, 2002; Zemanová *et al.*, 2008; Kim and Cha, 2003; Desai and Papoutsakis, 1999; Ji *et al.*, 2004; Eisenhut *et al.*, 2012). AsRNA:lla on useita tapoja vaikuttaa geenien ekspressioon (Tufarelli *et al.*, 2003; Camblong *et al.*, 2007; Gelfand *et al.*, 2011), mutta geenitekniikan näkökulmasta sen helpoiten valjastettavissa oleva säätelyominaisuus on geenin lähetti-RNA:han vaikuttaminen. AsRNA voi pariuutua komplementaarisen lähetti-RNA:n kanssa muodostaen kaksoisjuosteisen RNA:n, jolloin lähetti-RNA:n translaatio estyy ja lopulta RNAasi H -proteiini hajottaa lähetti-RNA:n (Vickers and Crooke, 2014). Vaihtoehtoisesti AsRNA voi estää muiden

ekspressiota hiljentävien RNA-elementtien sitoutumisen lähetti-RNA:han, jolloin seurauksena on puolestaan ekspression vahvistuminen (Ørom *et al.*, 2006).



Kuva 7. Locked nucleic acid (LNA) ja RNA -sokerirunkojen kemiallisten rakenteiden viivakaavat.

Antisense RNA -ilmiöön perustuvaa geenisäätelyä on onnistuttu tehostamaan korvaamalla oligonukleotidin sokerirungon ribosimolekyyli LNA:lla (locked nucleic acid) (kuva 7) (Sarma *et al.*, 2010). LNA on ribosista johdettu molekyyli, joka kykenee muodostamaan nukleinihappoketjuja DNA:n ja RNA:n tavoin. LNA eroaa rakenteellisesti ribosista siten, että 2'-hiilen happiatomia ja 4'-hiiltä yhdistää ylimääräinen hiilisilta. LNA muistuttaa toiminnallisesti tavanomaisia nukleinihappoja, ja niiden on jopa todettu muodostavan RNA:ta ja DNA:ta stabiilimpia rakenteita. (Petersen and Wengel, 2003) LNA:lla on myös korkeampi affiniteetti paritua RNA-juosteiden kanssa, mikä edesauttaa LNA-pohjaisten antisense oligonukleotidejen todennäköisyyttä vaikuttaa kohde-RNA:han ennen sen translaatiota (Sarma *et al.*, 2010). Posttranskriptionaalisenä menetelmänä LNA:n aiheuttama geenien hiljennysvaikutus voidaan lisäksi saada palautuvaksi esimerkiksi tekemällä LNA-oligonukleotidia ilmentävän vektoriplasmidin promoottori indusoivasta aineesta riippuvaiseksi (Nakashima and Tamura, 2009). LNA-oligonukleotidien on kuitenkin todettu aiheuttavan sivuvaikutuksia paritumalla epätäydellisesti komplementaaristen RNA-juosteiden kanssa, minkä lisäksi mahdollisimman tehokkaan LNA-oligonukleotidin suunnittelu on työlästä ja kallista (Stojic *et al.*, 2018).

4.1.2 RNAi

Antisense RNA:n tavoin myös RNAi-menetelmän toiminta perustuu RNA-molekyyliin, jotka paritumisellaan aiheuttavat kohde-RNA:n hajoamisen tai sen translaation estymisen. RNAi:llä viitataan kuitenkin tapahtumaan, jossa lähetti-RNA:han voi vaikuttaa kaksi

erityistä RNA-molekyylejä, nimittäin 21–25 emäsparin kokoinen siRNA (small interfering RNA) (Hamilton and Baulcombe, 1999) tai noin 22 emäsparin kokoinen miRNA (microRNA) (Lee *et al.*, 1993).

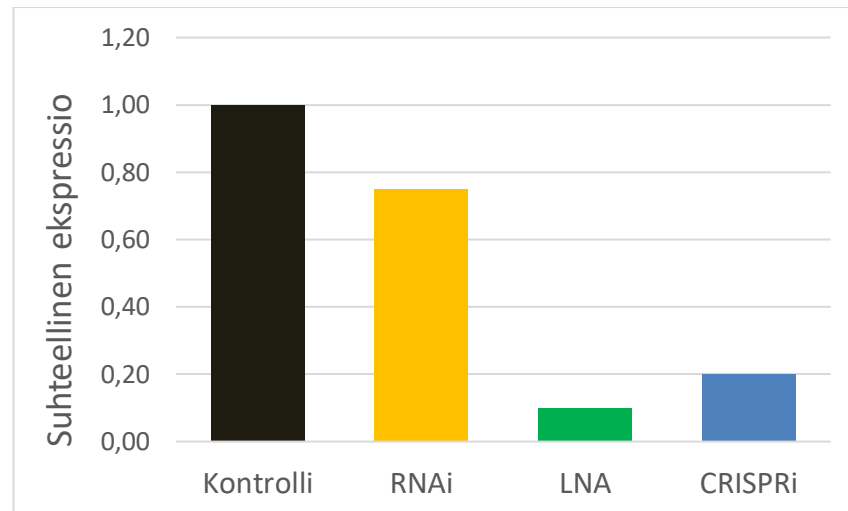
Toiminnallinen siRNA voidaan valmistaa joko kaksijuosteisesta esi-RNA:sta tai miRNA:n kaltaisesta RNA:sta, jossa yksijuosteinen RNA on hiusneulamaisen laskostumisen seurauksena pariutunut itsensä kanssa. Dicer-proteiini pilkkoo esi-RNA:n valmiiksi siRNA:ksi tai miRNA:ksi (Grishok *et al.*, 2001; Bernstein *et al.*, 2001). Toisin kuin asRNA:n tapauksessa, siRNA ja miRNA eivät ole sytoplasmassa yksijuosteisina RNA-molekyyleinä, vaan ne ovat sitoutuneena joko kohde-RNA:han tai RISC-proteiinikompleksiin (RNA-induced silencing complex). RISC-kompleksiin sitoutunut siRNA tai miRNA pariutuu kohde-RNA:n kanssa, minkä jälkeen RISC aiheuttaa kohde-RNA:n hajoamisen (Rand *et al.*, 2005).

RNAi-tekniikalla on kaksi huomionarvoista heikkoutta: rajoitetut sovelluskohteet ja taipumus sivuvaikutuksiin. RNAi vaatii isäntäsolultaan ennalta määrätyn proteiinikoneiston, jonka avulla siRNA ja miRNA estävät geenien ilmentämistä. RNAi:n käyttökohteiksi soveltuvat hyvin kasvisolut ja eukaryootit, mutta luonnollisissa prokaryoteissa RNAi ei ole mahdollista toteuttaa ilman, että niille luodaan keinotekoisesti menetelmän edellyttämä proteiinikoneisto, mikä saattaa olla kohtuuttoman työlästä suhteutettuna RNAi:lla saavutettavaan hyötyyn. Tämän lisäksi RNAi:n käytännöllisyyttä rajoittaa sivuvaikutusten riski, joka johtuu siRNA:n (Birmingham *et al.*, 2006; Jackson *et al.*, 2003) ja miRNA:n (Lewis *et al.*, 2003; Friedman *et al.*, 2009) epäspesifisyydestä hajotettavien pariutumiskohteiden valinnassa. Runsas RNAi:n käyttö voi myös aiheuttaa kilpailua RISC-sitoutumiskoista keinotekoisesti transfektoidun siRNA:n ja solun luonnollisen miRNA:n välillä, jolloin niin ikään luonnolliset säätelyreitit voivat häiriintyä ja aiheuttaa arvaamattomia sivuvaikutuksia (Khan *et al.*, 2009).

4.2 Hiljennystehokkuus

Esimerkiksi hinta, monimutkaisuus ja nopeus ovat merkityksettömiä ominaisuuksia, mikäli geenisäätelytekniikka ei kykene toteuttamaan tärkeintä tehtäväänsä eli geenin hiljentämistä. Geenin hiljentämiseen liittyy edelleen keskeisinä ominaisuuksina menetelmän hiljennystehokkuus, eli kuinka voimakkaasti geenin ilmentämistä kyetään vaimentamaan sekä hiljentämismekanismin dynaamisuus, eli esimerkiksi kyky säätää hiljennystehokkuus juuri halutulle tasolle. Geenin hiljennystehokkuuden ja sen dynaamisuuden

voidaankin ajatella olevan tärkeimpiä ominaisuuksia, joiden perusteella ryhdytään ensisijaisesti määrittelemään geenisäätelytekniikan potentiaalia. RNAi, LNA ja CRISPRi -geenisäätelymenetelmille on suoritettu hiljennystehokkuuteen kohdennettua vertailua (kuva 8) (Stojic *et al.*, 2018). Tutkimuksen perusteella LNA- (90 %) ja CRISPRi-menetelmät (70–90 %) erottuivat hiljennystehokkuudeltaan selkeästi RNAi:stä (25 %). Erillinen CRISPRi:tä ja RNAi:tä vertaillut tutkimus (Zheng *et al.*, 2018) on myös linjassa näiden tulosten kanssa.



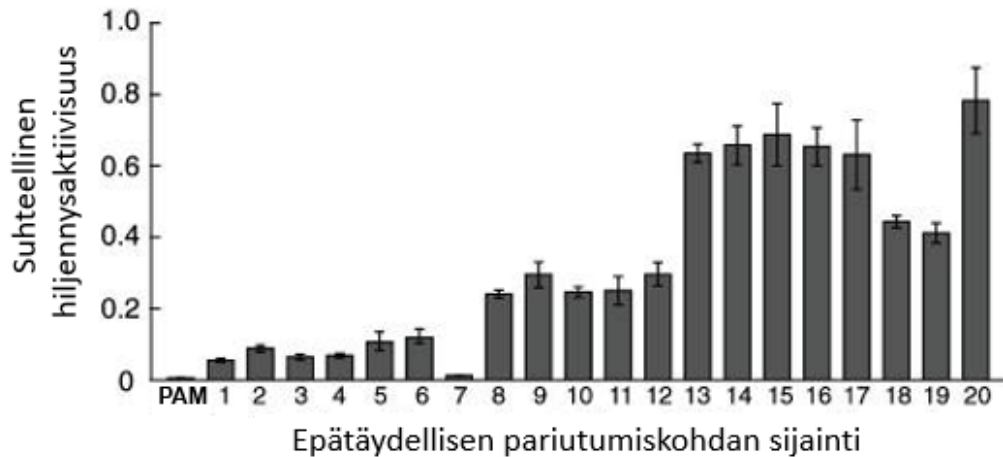
Kuva 8. Hiljennystehokkuuksien vertailua RNAi, LNA ja CRISPRi -menetelmien välillä. Testit suoritettiin ihmisperäisissä HeLa- ja HEK293T-solulinjoissa, joissa kohdegeeninä oli SLC25A25-AS1. Arvot edustavat suhteellisia ekspressiotasoja, jolloin arvo 1,00 vastaa geenin normaalia eli 100 %:n ekspressiotasoa. Muokattu lähteestä (Stojic *et al.*, 2018)

Kuten aiemmin todettiin, CRISPRi:n hiljennystehokkuus on suoraan verrannollista siihen, mitä lähemmäs hiljennettävän geenin promoottoria dCas9 sitoutuu. Tämä mahdollistaa tarkan hiljennystehokkuuden säätelyn, mikä on varsin hyödyllinen ominaisuus geenisäätelymenetelmälle. Vaikka tämä antaa CRISPRi:lle etua suhteessa muihin menetelmiin, on sillä silti myös haittapuolensa, sillä kaukana promoottorista sijaitsevaa yksittäistä eksonia ei välttämättä saada hiljennettyä niin vahvasti kuin haluttaisiin. Promoottorin hiljentäminen aiheuttaisi edelleen asiaankuuluvan eksonin vahvan hiljenemisen, mutta siinä tapauksessa myös suuri joukko muita eksoneita saattaisi hiljentyä aiheuttaen merkittäviä sivuvaikutuksia. Lähetti-RNA-molekyyleihin vaikuttavien säätelymenetelmien, kuten RNAi:n tapauksessa hiljennystehokkuuden säätely on kuitenkin hankalaa, sillä siRNA:n konsentraation kasvaessa hiljennystehokkuus nousee sekä kohdennettujen (Bartlett and Davis, 2006) että kohdentamattomien (Caffrey *et al.*, 2011; Grimm, 2011) geenien kohdalla, jolloin myös sivuvaikutukset voimistuvat.

4.3 Spesifisyys

Geenisäätelymenetelmille merkittävä ominaisuus on myös niiden spesifisyys eli kyky vaikuttaa mahdollisimman pieneen määrään erilaisia molekyyliä. Geenisäätelymenetelmän korkea spesifisyys vähentää kohdegeenin hiljentämisestä aiheutuvia sivuvaikutuksia, joilla voi olla arvaamattomia vaikutuksia isäntäorganismien toimintaan (Rayburn and Zhang, 2008). Spesifisyys voi nousta ratkaisevaksi tekijäksi geenien muokkaus- tai säätelymenetelmän valitsemisessa, kun halutaan luoda teollisissa olosuhteissa suuria, pitkäikäisiä ja tehokkaita bakteerikantoja. CRISPRi on todettu ennen kaikkea muita säätelymenetelmiä, kuten RNAi:tä spesifisemmäksi tekniikaksi (Evers *et al.*, 2016; Boettcher and McManus, 2015; Smith *et al.*, 2017; Larson *et al.*, 2013). Spesifisyyteen voidaan ajatella liittyvän kaksi merkittävää tekijää: kohdejuosteelta vaadittu komplementaarisuus ja sivuvaikutusten aiheutumisperiaate.

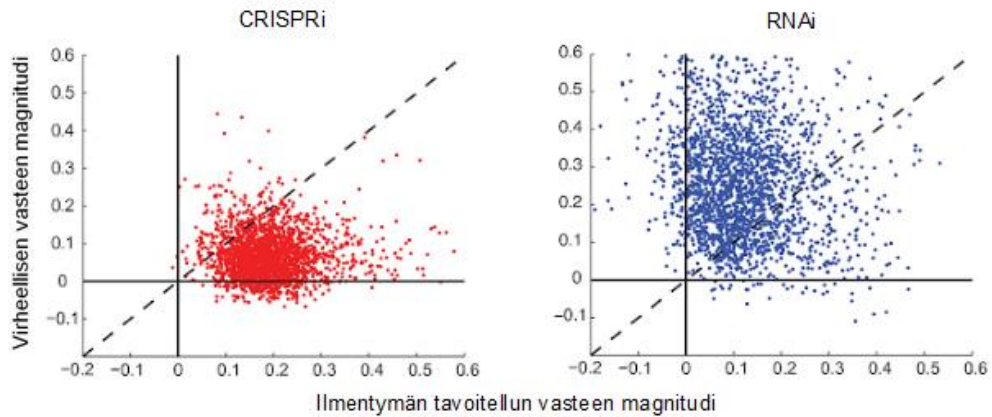
CRISPRi:lle, LNA:lle ja RNAi:lle on kaikille yhteistä, että ekspressiosäätelyn kohde määräytyy niin säätelijäelementin kuin kohteenkin nukleotidisekvenssin perusteella. CRISPRi eroaa kahdesta muusta tekniikasta kuitenkin siinä, että se vaatii niitä täydellisempää komplementaarisuutta sgRNA:n ja kohteen välillä (Stojic *et al.*, 2018). RNAi:n hiljennyksestä vastaava siRNA voi aiheuttaa kohde-RNA:n hajoamisen jo 7 nukleotidin komplementaarisen pariutumisen seurauksena, minkä takia kohdentamattomien geenien hiljennys voi olla joissakin tapauksissa jopa hyvin yleistä (Lin *et al.*, 2005). LNA puolestaan vaikuttaa epätäydellisesti komplementaarisuuteen kohdejuosteisiin jopa useammin kuin RNAi (Stojic *et al.*, 2018). CRISPRi vaatii kohteeltaan täydellisen PAM-sekvenssin, minkä jälkeen myös sgRNA:n tulee olla riittävän komplementaarinen kohteen kanssa (kuva 9) (Qi *et al.*, 2013). CRISPRi:n onkin todettu vaikuttavan kohdentamattomiin geneihin harvemmin kuin LNA tai RNAi (Stojic *et al.*, 2018).



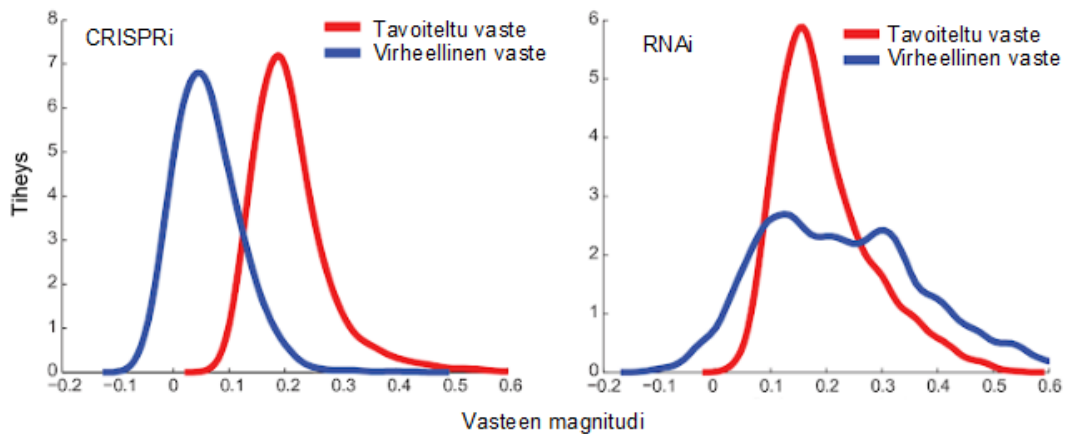
Kuva 9. SgRNA-juosteen epätäydellisen komplementaarisuuden vaikutus kohteen hiljentämiseen. Pariutumiskohdan sijainti kuvaa nukleotidin etäisyyttä PAM-sekvenssistä. Kunkin pylvään korkeus merkitsee hiljennysaktiivisuutta tilanteessa, jossa kyseinen nukleotidi on ainut sgRNA:n pariutumaton nukleotidi. Muokattu lähteestä (Qi et al., 2013)

Säätelytekniikan toimintaperiaate vaikuttaa lisäksi siihen, kuinka helposti kohdentamattoman geenin hiljentäminen voidaan havaita. CRISPRi:n tapauksessa mahdolliset sgRNA:n komplementaarisuudesta johtuvat sivuvaikutukset voidaan oletettavasti nähdä jo lyhyellä aikavälillä, sillä dCas9-kompleksit sitoutuvat varsin nopeasti mahdollisiin kohteisiinsa DNA:ssa, jolloin myös kohdentamattomat geenit hiljenevät nopeasti (Xue *et al.*, 2017). RNAi:n ja LNA:n kaltaisilla lähetti-RNA:han vaikuttavilla menetelmillä sivuvaikutukset voivat puolestaan realisoitua vasta pitkänkin aikavälin jälkeen: aluksi säätelyelementti vaikuttaa oikeaan kohdejuosteeseen, mutta myöhemmin sattumanvaraisesti tai olosuhteiden muuttuessa säätelyelementti voikin vaikuttaa kohdentamattomaan mutta kuitenkin riittävän komplementaariseen kohdejuosteeseen. (Latham and Wilson, 2010)

Transkriptiotasolla vaikuttavan CRISPRi:n ja lähetti-RNA:han vaikuttavan RNAi:n spesifisyyttä ja käyttäytymistä on tutkittu ja datan perusteella voidaan todeta CRISPRi:n käyttäytyvän varsin ennalta-arvattavasti, kun taas RNAi:n tapauksessa vain harva säätelyelementti toimii halutulla tavalla (kuva 10) (Smith *et al.*, 2017). Magnitudijakaumista puolestaan huomataan, että virheelliset vasteet ovat jakautuneet hyvin epätasaisesti, joka antaa viitteitä RNAi:n arvaamattomasta käyttäytymisestä (kuva 11). Vastaavasti CRISPRi:n tapauksessa vaikutusten jakautuminen kohdennettuihin ja kohdentamattomiin geeneihin on hyvin systemaattista, mistä voidaan päätellä sattumalla olevan huomattavasti pienempi vaikutus säätelyelementin käyttäytymiseen kuin RNAi:n tapauksessa. (Smith *et al.*, 2017)



Kuva 10. Pistekaaviot, jotka kuvaavat CRISPRi:n ja RNAi:n toiminnallista luotettavuutta. Y-akseli kuvaa ilmentymän taipumusta aiheuttaa vastetta virheellisessä kohteessa, X-akseli kuvaa puolestaan taipumusta tavoitellun kohteen vasteeseen. Katkoviivan linjalla oleva piste kuvaa siis tilannetta, jossa ilmentymä aiheuttaa yhtä usein vasteen niin tavoitellussa kohteessa kuin myös virheellisessä kohteessa. Muokattu lähteestä (Smith et al., 2017)



Kuva 11. Jakaumat, jotka kuvaavat ilmentymien jakautumista niiden vasteiden magnitudien suhteen. Muokattu lähteestä (Smith et al., 2017)

4.4 Sovelluksia

CRISPRi:n soveltuvuutta metaboliamuokkaukseen on jo testattu runsaasti (taulukko 1). Tähänastisten tulosten perusteella CRISPRi ei kuitenkaan yllä tehokkuudeltaan vielä merkittävimpien julkaistujen tuottavuuksien tasolle. On kuitenkin huomionarvoista, että suurimmat tuottavuudet on yleensä saavutettu tutkimuksissa, joissa metaboliaa muokataan yhdistelemällä monia eri lähestymistapoja, eikä näiden tutkimusten tavoitteena tyypillisesti ole yksittäisen tekniikan tutkiminen vaan juurikin tuottavuuden maksimointi.

Taulukko 1. Esimerkkejä aineenvaihdunnan muokkauksella saavutetuista tuotantotehokkuuksista *Escherichia colissa*.

Lopputuote	CRISPRi		Muu menetelmä		Lähteet
	g/L	g/L/h	g/L	g/L/h	
3-hydroksipropionaatti	1,00	0,021	38,70	0,540	(Tarasava <i>et al.</i> , 2018; Rathnasingh <i>et al.</i> , 2009)
1,4-Butaanidioli	1,80	0,038	18,00	0,150	(Wu, M. <i>et al.</i> , 2017; Yim <i>et al.</i> , 2011)
Naringeniini	0,42	0,009	0,47	0,020	(Wu <i>et al.</i> , 2015; Xu <i>et al.</i> , 2011)
Butanoli	1,06	0,022	6,90	0,173	(Kim <i>et al.</i> , 2017; Saini <i>et al.</i> , 2017)
Resveratroli	0,30	0,006	0,17	-	(Wu, J. <i>et al.</i> , 2017; Katsuyama <i>et al.</i> , 2007)
Malaatti	36,00	0,600	9,25	0,740	(Gao <i>et al.</i> , 2018; Moon <i>et al.</i> , 2008)

Vaikka suurimmat lopputuotteiden pitoisuudet ja tuottavuudet on saavutettu enimmäkseen muilla menetelmillä kuin CRISPRi:llä, eivät nämä luvut kuitenkaan kerro koko totuutta menetelmän käytännöllisyydestä tai kannattavuudesta. CRISPRi tekniikan avulla saavutettiin jopa 18 g/L 1,4-butaanidiolipitoisuus. Pitoisuuden pitäisi kasvaa vielä 3 – 5 kertaiseksi, jotta prosessista saataisiin taloudellisesti kannattava. (Yim *et al.*, 2011) Myös 3-hydroksipropionaatin valmistus CRISPRi:tä hyödyntämällä on todettu olevan potentiaalista huolimatta vielä taloudellisesti kannattamatonta (Rathnasingh *et al.*, 2009). CRISPRi:n on jo kuitenkin osoitettu olevan taloudellisesti potentiaalinen vaihtoehto esimerkiksi resveratrolin tapauksessa, sillä aikaansaatu tuottavuus on jopa yli kymmenkertainen muihin suhteellisen edullisiin menetelmiin nähden (Liu *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2013).

4.5 Tulosten tulkinta

Geenisäätelymenetelmien paremmuutta ei voida määritellä yksiselitteisesti pelkkien vertailudatan lukujen avulla. Eri säätelymenetelmillä on erilaiset vahvuudet, minkä takia niiden käytännöllisyys riippuu aina käyttöyhteydestä. Tekniikan käytännöllisyyteen voi vai-

kuttaa esimerkiksi transfektoinnin vaikeus, kohdegeenin tai sen transkriptin ominaisuudet, käytettävissä oleva aika, tekniikalta edellytetty spesifisyys, tai taloudellisuuden merkitys suhteessa laatuun (taulukko 2).

Taulukko 2. Yhteenveto CRISPRi, RNAi, LNA ja knockout-menetelmien ominaisuuksista.

	Kyllä	Ei
Mahdollisuus vaikuttaa elintärkeisiin geeneihin	CRISPRi, RNAi, LNA	Knockout
Säädettävä tehokkuus	CRISPRi, RNAi, LNA	Knockout
Sivuvaikutukset vähäisiä	CRISPRi	LNA, RNAi, knockout
Kallis toteuttaa	LNA, knockout	CRISPRi, RNAi
Nopea toteuttaa	RNAi, CRISPRi	LNA, knockout
Helppo suunnitella	RNAi, CRISPRi	LNA, knockout
Rajoitetut kohdegenit	CRISPRi, RNAi, LNA	Knockout

Tässä opinnäytetyössä esitetyn otannan perusteella CRISPRi on spesifisempi geenien hiljennysmenetelmä kuin RNAi tai asRNA. LNA-antisense-menetelmä kykenee parhaimmillaan CRISPRi:n kaltaisiin hiljennystehokkuuksiin, mutta spesifisyys on heikompi kuin CRISPRi:llä. (Stojic *et al.*, 2018) CRISPRi:n rajoite on PAM-sekvenssien rajoittama kohdegeenin valikoima.

CRISPRi:n kyky vaikuttaa samanaikaisesti useihin geeneihin mahdollistaa suoraviivaisempaa metaboliamuokkausprosessien suunnittelua ja toteutusta. RNAi:n ja asRNA:n kaltaisesti myös CRISPRi:n vaikutuksen säädeltävyys on yksi sen merkittävimmistä eduista suhteessa knockout-menetelmiin. Esimerkiksi aineenvaihduntareittiä varten hiljennettävä, mutta myös kasvua edistävä geeni voidaan CRISPRi:n avulla hiljentää vasta sitten, kun populaatio on kasvanut optimaalisen suuruiseksi (Kim *et al.*, 2016). Tämä mahdollisuus puuttuu tyypillisesti genomia muokkaavilta knockout-menetelmiltä (Cano-naco *et al.*, 2001). Aineenvaihduntareitin liian suuri aktivoiminen voi olla lisäksi solulle myrkyllistä, mikä saattaa olla knockout-menetelmille haastava ongelma ratkaista (Zhang *et al.*, 2012).

5. YHTEENVETO

Tässä työssä kartoitettiin CRISPR-interferenssin ominaisuuksia ja soveltuvuutta teollisen metaboliamuokkauksen työkaluksi. Lisäksi koottiin muihin tutkimuksiin pohjautuvaa vertailua sen käytännöllisyydestä suhteessa tunnetuimpiin säätelymenetelmiin sekä knockout-menetelmiin yleisesti. Kiinnostavia vertailukohtia olivat muun muassa menetelmien hiljennystehokkuudet, spesifisyydet ja soveltamisilla aikaansaadut tuottavuudet.

CRISPR-interferenssi osoittautui monella tapaa yleisimpiä säätelymenetelmiä, eli RNA-interferenssiä ja antisense-RNA:ta suotuisammaksi menetelmäksi. Niissä tapauksissa, joissa muut menetelmät saavuttivat CRISPR-interferenssin kaltaisen hiljennystehokkuuden, ne hävisivät kuitenkin CRISPR-interferenssille sivuvaikutuksien määrässä. PAM-sekvenssin rajoittama kohdegeenien määrä vaikuttaisi olevan CRISPR-interferenssin ainoa huomionarvoinen heikkous.

Vaikka CRISPR-interferenssillä ei tässä työssä tarkastelluissa tutkimuksissa päästy suurimpien julkaistujen tuottavuuksien tasolle, niin CRISPRi tekniikan avulla toteutettavan geenien hiljentämisen säädeltävyys, palautuvuus ja tarkkuus antavat viitteitä siitä, että tekniikkaa voitaisiin hyödyntää esimerkiksi tapauksissa, joissa organismille elintärkeää geeniä ei voida poistaa tai hiljentää täysin. Tulevaisuudessa CRISPR-interferenssin taloudellisuus saattaa myös nousta ratkaisevaksi tekijäksi käytännöllisimmän metaboliamuokkaustekniikan valinnassa.

On mahdotonta määritellä yksiselitteisesti parasta metaboliamuokkaustekniikkaa, sillä kaikilla menetelmillä on omat käyttöyhteyksistä riippuvat vahvuutensa, kuten helppokäyttöisyys, taloudellisuus tai tarkkuus. CRISPR-interferenssi tarjoaa kuitenkin erinomaisen aihion metaboliamuokkauksen työkaluksi, mutta lisää tutkimusta ja sovelluksia tarvitaan, jotta siitä saataisiin parhaimpien metaboliamuokkaussaavutuksien valossa vertailukelpoinen ja taloudellisesti kannattava menetelmä.

LÄHTEET

- Alkhnabashi, O.S., Saunders, S.J., Costa, F., Backofen, R., Garrett, R.A. and Shah, S.A. (2016) 'Characterizing leader sequences of CRISPR loci', *Bioinformatics*, 32(17), pp. i576-i585.
- Alper, H.S. and Avalos, J.L. (2018) 'Metabolic pathway engineering', *Synthetic and Systems Biotechnology*, 3(1), pp. 1-2.
- Anders, C., Niewoehner, O., Duerst, A. and Jinek, M. (2014) 'Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease', *Nature*, 513(7519), pp. 569-573.
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D.A. and Horvath, P. (2007) 'CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes', *Science*, 315(5819), pp. 1709.
- Bartlett, D.W. and Davis, M.E. (2006) 'Insights into the kinetics of siRNA-mediated gene silencing from live-cell and live-animal bioluminescent imaging', *Nucleic acids research*, 34(1), pp. 322-333.
- Beerli, R.R., Segal, D.J., Dreier, B. and Barbas, C.F., 3 (1998) 'Toward controlling gene expression at will: specific regulation of the erbB-2/HER-2 promoter by using polydactyl zinc finger proteins constructed from modular building blocks', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(25), pp. 14628-14633.
- Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M. and Hannon, G.J. (2001) 'Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference', *Nature*, 409(6818), pp. 363-366.
- Bikard, D. and Marraffini, L.A. (2013) 'Control of gene expression by CRISPR-Cas systems', *F1000prime reports*, 5, pp. 47; 47-47.
- Birmingham, A., Anderson, E.M., Reynolds, A., Ilsley-Tyree, D., Leake, D., Fedorov, Y., Baskerville, S., Maksimova, E., Robinson, K., Karpilow, J., Marshall, W.S. and Khvorovova, A. (2006) '3' UTR seed matches, but not overall identity, are associated with RNAi off-targets', *Nature Methods*, 3(3), pp. 199-204.
- Boettcher, M. and McManus, M.T. (2015) 'Choosing the Right Tool for the Job: RNAi, TALEN, or CRISPR', *Molecular cell*, 58(4), pp. 575-585.
- Brantl, S. (2002) 'Antisense-RNA regulation and RNA interference', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 1575(1), pp. 15-25.
- Brouns, S.J.J., Jore, M.M., Lundgren, M., Westra, E.R., Slijkhuis, R.J.H., Snijders, A.P.L., Dickman, M.J., Makarova, K.S., Koonin, E.V. and van, d.O. (2008) 'Small CRISPR RNAs Guide Antiviral Defense in Prokaryotes', *Science*, 321(5891), pp. 960.
- Caffrey, D.R., Zhao, J., Song, Z., Schaffer, M.E., Haney, S.A., Subramanian, R.R., Seymour, A.B. and Hughes, J.D. (2011) 'siRNA off-target effects can be reduced at concentrations that match their individual potency', *PloS one*, 6(7), pp. e21503.
- Camblong, J., Iglesias, N., Fickentscher, C., Dieppois, G. and Stutz, F. (2007) 'Antisense RNA Stabilization Induces Transcriptional Gene Silencing via Histone Deacetylation in *S. cerevisiae*', *Cell*, 131(4), pp. 706-717.

- Canonaco, F., Hess, T.A., Heri, S., Wang, T., Szyperski, T. and Sauer, U. (2001) 'Metabolic flux response to phosphoglucose isomerase knock-out in *Escherichia coli* and impact of overexpression of the soluble transhydrogenase UdhA', *FEMS microbiology letters*, 204(2), pp. 247-252.
- Cleto, S., Jensen, J.V.K., Wendisch, V.F. and Lu, T.K. (2016) 'Corynebacterium glutamicum Metabolic Engineering with CRISPR Interference (CRISPRi)', *ACS Synthetic Biology*, 5(5), pp. 375-385.
- Das, A.T., Binda, C.S. and Berkhout, B. (2019) 'Elimination of infectious HIV DNA by CRISPR-Cas9', *Current Opinion in Virology*, 38, pp. 81-88.
- Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C.M., Gonzales, K., Chao, Y., Pirzada, Z.A., Eckert, M.R., Vogel, J. and Charpentier, E. (2011) 'CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III', *Nature*, 471(1), pp. 602.
- Deng, L., Kenchappa, C.S., Peng, X., She, Q. and Garrett, R.A. (2012) 'Modulation of CRISPR locus transcription by the repeat-binding protein Cbp1 in *Sulfolobus*', *Nucleic acids research*, 40(6), pp. 2470-2480.
- Desai, R.P. and Papoutsakis, E.T. (1999) 'Antisense RNA strategies for metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum*', *Applied and Environmental Microbiology*, 65(3), pp. 936-945.
- Dickinson, D.J. and Goldstein, B. (2016) 'CRISPR-Based Methods for *Caenorhabditis elegans* Genome Engineering', *Genetics*, 202(3), pp. 885-901.
- Díez-Villaseñor, C., Guzmán, N.M., Almendros, C., García-Martínez, J. and Mojica, F.J.M. (2013) 'CRISPR-spacer integration reporter plasmids reveal distinct genuine acquisition specificities among CRISPR-Cas I-E variants of *Escherichia coli*', *RNA Biology*, 10(5), pp. 792-802.
- Ecco, G., Imbeault, M. and Trono, D. (2017) 'KRAB zinc finger proteins', *Development*, 144(15), pp. 2719-2729.
- Eisenhut, M., Georg, J., Klähn, S., Sakurai, I., Mustila, H., Zhang, P., Hess, W.R. and Aro, E. (2012) 'The antisense RNA As1_flv4 in the Cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 prevents premature expression of the flv4-2 operon upon shift in inorganic carbon supply', *The Journal of biological chemistry*, 287(40), pp. 33153-33162.
- Erdmann, S. and Garrett, R.A. (2012) 'Selective and hyperactive uptake of foreign DNA by adaptive immune systems of an archaeon via two distinct mechanisms', *Molecular microbiology*, 85(6), pp. 1044-1056.
- Evers, B., Jastrzebski, K., Heijmans, J.P.M., Grenrum, W., Beijersbergen, R.L. and Bernards, R. (2016) 'CRISPR knockout screening outperforms shRNA and CRISPRi in identifying essential genes', *Nature biotechnology*, 34(1), pp. 631.
- Fokum, E., Zabed, H.M., Guo, Q., Yun, J., Yang, M., Pang, H., An, Y., Li, W. and Qi, X. (2019) 'Metabolic engineering of bacterial strains using CRISPR/Cas9 systems for biosynthesis of value-added products', *Food Bioscience*, 28, pp. 125-132.
- Friedman, R.C., Farh, K.K., Burge, C.B. and Bartel, D.P. (2009) 'Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs', *Genome research*, 19(1), pp. 92-105.
- Gao, C., Wang, S., Hu, G., Guo, L., Chen, X., Xu, P. and Liu, L. (2018) 'Engineering *Escherichia coli* for malate production by integrating modular pathway characterization with CRISPRi-guided multiplexed metabolic tuning', *Biotechnology and bioengineering*, 115(3), pp. 661-672.

- Garrett, R.A., Shah, S.A., Erdmann, S., Liu, G., Mousaei, M., León-Sobrino, C., Peng, W., Gudbergdottir, S., Deng, L., Vestergaard, G., Peng, X. and She, Q. (2015) 'CRISPR-Cas Adaptive Immune Systems of the Sulfolobales: Unravelling Their Complexity and Diversity', *Life (Basel, Switzerland)*, 5(1), pp. 783-817.
- Garrett, R.A., Vestergaard, G. and Shah, S.A. (2011) 'Archaeal CRISPR-based immune systems: exchangeable functional modules', *Trends in Microbiology*, 19(11), pp. 549-556.
- Gasiunas, G., Barrangou, R., Horvath, P. and 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), pp. E2579-E2586.
- Gelfand, B., Mead, J., Bruning, A., Apostolopoulos, N., Tadigotla, V., Nagaraj, V., Sengupta, A.M. and Vershon, A.K. (2011) 'Regulated Antisense Transcription Controls Expression of Cell-Type-Specific Genes in Yeast', *Molecular and cellular biology*, 31(8), pp. 1701-1709.
- Gordon, G.C., Korosh, T.C., Cameron, J.C., Markley, A.L., Begemann, M.B. and Pfleger, B.F. (2016) 'CRISPR interference as a titratable, trans-acting regulatory tool for metabolic engineering in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7002', *Metabolic engineering*, 38(1), pp. 170-179.
- Grimm, D. (2011) 'The dose can make the poison: lessons learned from adverse in vivo toxicities caused by RNAi overexpression', *Silence*, 2(1), pp. 8.
- Grishok, A., Pasquinelli, A.E., Conte, D., Li, N., Parrish, S., Ha, I., Baillie, D.L., Fire, A., Ruvkun, G. and Mello, C.C. (2001) 'Genes and Mechanisms Related to RNA Interference Regulate Expression of the Small Temporal RNAs that Control *C. elegans* Developmental Timing', *Cell*, 106(1), pp. 23-34.
- Hamilton, A.J. and Baulcombe, D.C. (1999) 'A Species of Small Antisense RNA in Posttranscriptional Gene Silencing in Plants', *Science*, 286(5441), pp. 950-952.
- Hibbing, M.E., Fuqua, C., Peterson, S.B. and Parsek, M.R. (2010) 'Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle', *Nature Reviews Microbiology*, 8(1), pp. 15-25.
- Higo, A., Isu, A., Fukaya, Y., Ehira, S. and Hisabori, T. (2018) 'Application of CRISPR Interference for Metabolic Engineering of the Heterocyst-Forming Multicellular Cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120', *Plant and Cell Physiology*, 59(1), pp. 119-127.
- Huang, C., Shen, C.R., Li, H., Sung, L., Wu, M. and Hu, Y. (2016) 'CRISPR interference (CRISPRi) for gene regulation and succinate production in cyanobacterium *S. elongatus* PCC 7942', *Microbial cell factories*, 15(1), pp. 196.
- Ishino, Y., Krupovic, M. and Forterre, P. (2018) 'History of CRISPR-Cas from Encounter with a Mysterious Repeated Sequence to Genome Editing Technology', *Journal of Bacteriology*, 200(7), pp. 580.
- Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M. and Nakata, A. (1987) 'Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product.', *Journal of Bacteriology*, 169(12), pp. 5429-5433.
- Jackson, A.L., Bartz, S.R., Schelter, J., Kobayashi, S.V., Burchard, J., Mao, M., Li, B., Cavet, G. and Linsley, P.S. (2003) 'Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi', *Nature biotechnology*, 21(6), pp. 635-637.

- Jansen, R., van Embden, J.D., Gaastra, W. and Schouls, L.M. (2002) 'Identification of a novel family of sequence repeats among prokaryotes', *Omicron : a journal of integrative biology*, 6(1), pp. 23-33.
- Ji, Y., Yin, D., Fox, B., Holmes, D.J., Payne, D. and Rosenberg, M. (2004) 'Validation of antibacterial mechanism of action using regulated antisense RNA expression in *Staphylococcus aureus*', *FEMS microbiology letters*, 231(2), pp. 177-184.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A. and Charpentier, E. (2012) 'A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity', *Science*, 337(6096), pp. 816-821.
- Jinek, M., East, A., Cheng, A., Lin, S., Ma, E. and Doudna, J. (2013) 'RNA-programmed genome editing in human cells', *eLife*, 2013(2), pp. e00471.
- Karimi, Z., Ahmadi, A., Najafi, A. and Ranjbar, R. (2018) 'Bacterial CRISPR Regions: General Features and their Potential for Epidemiological Molecular Typing Studies', *The open microbiology journal*, 12(1), pp. 59-70.
- Karvelis, T., Gasiunas, G., Miksys, A., Barrangou, R., Horvath, P. and Siksnys, V. (2013) 'crRNA and tracrRNA guide Cas9-mediated DNA interference in *Streptococcus thermophilus*', *RNA Biology*, 10(5), pp. 841-851.
- Katsuyama, Y., Funa, N., Miyahisa, I. and Horinouchi, S. (2007) 'Synthesis of Unnatural Flavonoids and Stilbenes by Exploiting the Plant Biosynthetic Pathway in *Escherichia coli*', *Chemistry & Biology*, 14(6), pp. 613-621.
- Khan, A.A., Betel, D., Miller, M.L., Sander, C., Leslie, C.S. and Marks, D.S. (2009) 'Transfection of small RNAs globally perturbs gene regulation by endogenous microRNAs', *Nature biotechnology*, 27(6), pp. 549-555.
- Kim, J.Y.H. and Cha, H.J. (2003) 'Down-regulation of acetate pathway through antisense strategy in *Escherichia coli*: Improved foreign protein production', *Biotechnology and bioengineering*, 83(7), pp. 841-853.
- Kim, S.K., Han, G.H., Seong, W., Kim, H., Kim, S., Lee, D. and Lee, S. (2016) 'CRISPR interference-guided balancing of a biosynthetic mevalonate pathway increases terpenoid production', *Metabolic Engineering*, 38(1), pp. 228-240.
- Kim, S.K., Seong, W., Han, G.H., Lee, D. and Lee, S. (2017) 'CRISPR interference-guided multiplex repression of endogenous competing pathway genes for redirecting metabolic flux in *Escherichia coli*', *Microbial cell factories*, 16(1), pp. 188; 188-188.
- Kleinstiver, B.P., Pattanayak, V., Prew, M.S., Tsai, S.Q., Nguyen, N.T., Zheng, Z. and Joung, J.K. (2016) 'High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects', *Nature*, 529(7587), pp. 490-495.
- Koonin, E.V., Makarova, K.S. and Zhang, F. (2017) 'Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems', *Current opinion in microbiology*, 37(1), pp. 67-78.
- Larson, M.H., Gilbert, L.A., Wang, X., Lim, W.A., Weissman, J.S. and Qi, L.S. (2013) 'CRISPR interference (CRISPRi) for sequence-specific control of gene expression', *Nature protocols*, 8(11), pp. 2180-2196.
- Latham, J. and Wilson, A. (2010) *Off-target Effects of Plant Transgenic RNAi: Three Mechanisms Lead to Distinct Toxicological and Environmental Hazards, Draft Report 2010*. Ithica: The Bioscience Resource Project.

- Lee, R.C., Feinbaum, R.L. and Ambros, V. (1993) 'The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*', *Cell*, 75(5), pp. 843-854.
- Lewis, B.P., Shih, I., Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D.P. and Burge, C.B. (2003) 'Prediction of Mammalian MicroRNA Targets', *Cell*, 115(7), pp. 787-798.
- Li, S., Jendresen, C.B., Grünberger, A., Ronda, C., Jensen, S.I., Noack, S. and Nielsen, A.T. (2016) 'Enhanced protein and biochemical production using CRISPRi-based growth switches', *Metabolic Engineering*, 38(1), pp. 274-284.
- Lillestøl, R.K., Shah, S.A., Brügger, K., Redder, P., Phan, H., Christiansen, J. and Garrett, R.A. (2009) 'CRISPR families of the crenarchaeal genus *Sulfolobus*: bidirectional transcription and dynamic properties', *Molecular microbiology*, 72(1), pp. 259-272.
- Lin, X., Ruan, X., Anderson, M.G., McDowell, J.A., Kroeger, P.E., Fesik, S.W. and Shen, Y. (2005) 'siRNA-mediated off-target gene silencing triggered by a 7 nt complementation', *Nucleic acids research*, 33(14), pp. 4527-4535.
- Liu, X., Lin, J., Hu, H., Zhou, B. and Zhu, B. (2016) 'De novo biosynthesis of resveratrol by site-specific integration of heterologous genes in *Escherichia coli*', *FEMS microbiology letters*, 363(8), pp. 10.1093/femsle/fnw061. Epub 2016 Mar 13.
- Lundgren, M., Charpentier, E. and Fineran, P.C. (2015) *CRISPR : Methods and Protocols*. New York: Humana Press.
- Lv, L., Ren, Y., Chen, J., Wu, Q. and Chen, G. (2015) 'Application of CRISPRi for prokaryotic metabolic engineering involving multiple genes, a case study: Controllable P(3HB-co-4HB) biosynthesis', *Metabolic Engineering*, 29(1), pp. 160-168.
- Magocha, T.A., Zayed, H., Yang, M., Yun, J., Zhang, H. and Qi, X. (2018) 'Improvement of industrially important microbial strains by genome shuffling: Current status and future prospects', *Bioresource technology*, 257, pp. 281-289.
- Makarova, K.S., Haft, D.H., Barrangou, R., Brouns, S.J.J., Charpentier, E., Horvath, P., Moineau, S., Mojica, F.J.M., Wolf, Y.I., Yakunin, A.F., van, d.O. and Koonin, E.V. (2011) 'Evolution and classification of the CRISPR–Cas systems', *Nature Reviews Microbiology*, 9, pp. 467.
- 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, d.O., Backofen, R. and Koonin, E.V. (2015) 'An updated evolutionary classification of CRISPR–Cas systems', *Nature Reviews Microbiology*, 13, pp. 722.
- Makarova, K.S., Wolf, Y.I. and Koonin, E.V. (2018) 'Classification and Nomenclature of CRISPR–Cas Systems: Where from Here?', *The CRISPR Journal*, 1(5), pp. 325-336.
- Makarova, K.S., Wolf, Y.I. and Koonin, E.V. (2013) 'The basic building blocks and evolution of CRISPR–Cas systems', *Biochem Soc Trans*, 41(6), pp. 1392.
- Marintcheva, B. (2018) 'Chapter 3 - Viral Tools for Genome Manipulations In Vivo', in Marintcheva, B. (ed.) *Harnessing the Power of Viruses* London; San Diego: Academic Press, pp. 69-102.
- McGinn, J. and Marraffini, L.A. (2019) 'Molecular mechanisms of CRISPR–Cas spacer acquisition', *Nature Reviews Microbiology*, 17(1), pp. 7-12.

- Mojica, F.J.M., Juez, G. and Rodriguez-Valera, F. (1993) 'Transcription at different salinities of *Haloflex mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites', *Molecular microbiology*, 9(3), pp. 613-621.
- Mojica, F.J.M., Diez-Villasenor, C., Garcia-Martinez, J. and Soria, E. (2005) 'Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements', *Journal of Molecular Evolution*, 60(2), pp. 174-182.
- Mojica, F.J.M. and Garrett, R.A. (2013) 'Discovery and seminal developments in the CRISPR field' Berlin, Heidelberg: Springer, pp. 24-25.
- Moon, S.Y., Hong, S.H., Kim, T.Y. and Lee, S.Y. (2008) 'Metabolic engineering of *Escherichia coli* for the production of malic acid', *Biochemical Engineering Journal*, 40(2), pp. 312-320.
- Mougiakos, I., Bosma, E.F., Ganguly, J., van der Oost, J. and van Kranenburg, R. (2018) 'Hi-jacking CRISPR-Cas for high-throughput bacterial metabolic engineering: advances and prospects', *Current Opinion in Biotechnology*, 50, pp. 146-157.
- Nakashima, N. and Tamura, T. (2009) 'Conditional gene silencing of multiple genes with anti-sense RNAs and generation of a mutator strain of *Escherichia coli*', *Nucleic acids research*, 37(15), pp. e103.
- Nealson, K.H. (1999) 'Post-Viking Microbiology: New Approaches, New Data, New Insights', *Origins of Life and Evolution of the Biosphere*, 29(1), pp. 73-93.
- Nicolaou, S.A., Gaida, S.M. and Papoutsakis, E.T. (2010) 'A comparative view of metabolite and substrate stress and tolerance in microbial bioprocessing: From biofuels and chemicals, to biocatalysis and bioremediation', *Metabolic engineering*, 12(4), pp. 307-331.
- Ørom, U.A., Kauppinen, S. and Lund, A.H. (2006) 'LNA-modified oligonucleotides mediate specific inhibition of microRNA function', *Gene*, 372(1), pp. 137-141.
- Osborn, M.J., Belanto, J.J., Tolar, J. and Voytas, D.F. (2016) 'Gene editing and its application for hematological diseases', *International journal of hematology*, 104(1), pp. 18-28.
- Osborn, M.J., Webber, B.R., Knipping, F., Lonetree, C., Tennis, N., DeFeo, A.P., McElroy, A.N., Starker, C.G., Lee, C., Merkel, S., Lund, T.C., Kelly-Spratt, K.S., Jensen, M.C., Voytas, D.F., von Kalle, C., Schmidt, M., Gabriel, R., Hippen, K.L., Miller, J.S., Scharenberg, A.M., Tolar, J. and Blazar, B.R. (2016) 'Evaluation of TCR Gene Editing Achieved by TALENs, CRISPR/Cas9, and megaTAL Nucleases', *Molecular Therapy*, 24(3), pp. 570-581.
- Park, J., Shin, H., Lee, S., Um, Y. and Woo, H.M. (2018) 'RNA-guided single/double gene repressions in *Corynebacterium glutamicum* using an efficient CRISPR interference and its application to industrial strain', *Microbial Cell Factories*, 17(1), pp. 4-10.
- Pattanayak, V., Ramirez, C.L., Joung, J.K. and Liu, D.R. (2011) 'Revealing off-target cleavage specificities of zinc-finger nucleases by in vitro selection', *Nature Methods*, 8(9), pp. 765-772.
- Pelechano, V. and Steinmetz, L.M. (2013) 'Gene regulation by antisense transcription', *Nature Reviews Genetics*, 14(1), pp. 880.
- Petersen, M. and Wengel, J. (2003) 'LNA: a versatile tool for therapeutics and genomics', *Trends in Biotechnology*, 21(2), pp. 74-81.
- Politz, M.C., Copeland, M.F. and Pfleger, B.F. (2013) 'Artificial repressors for controlling gene expression in bacteria', *Chemical communications (Cambridge, England)*, 49(39), pp. 4325-4327.

Pourcel, C., Salvignol, G. and Vergnaud, G. (2005) 'CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies', *Microbiology*, 151(3), pp. 653-663.

Qi, L., Larson, M., Gilbert, L., Doudna, J., Weissman, J., Arkin, A. and Lim, W. (2013) 'Repurposing CRISPR as an RNA-Guided Platform for Sequence-Specific Control of Gene Expression', *Cell*, 152(5), pp. 1173-1183.

Rand, T.A., Petersen, S., Du, F. and Wang, X. (2005) 'Argonaute2 Cleaves the Anti-Guide Strand of siRNA during RISC Activation', *Cell*, 123(4), pp. 621-629.

Rath, D., Amlinger, L., Rath, A. and Lundgren, M. (2015) *The CRISPR-Cas immune system: Biology, mechanisms and applications*.

Rathnasingh, C., Raj, S.M., Jo, J. and Park, S. (2009) 'Development and evaluation of efficient recombinant *Escherichia coli* strains for the production of 3-hydroxypropionic acid from glycerol', *Biotechnology and bioengineering*, 104(4), pp. 729-739.

Rayburn, E.R. and Zhang, R. (2008) 'Antisense, RNAi, and gene silencing strategies for therapy: Mission possible or impossible?', *Drug Discovery Today*, 13(11), pp. 513-521.

Rothstein, R.J. (1983) 'One-step gene disruption in yeast', *Methods in enzymology*, 101(C), pp. 202-211.

Saini, M., Wang, Z.W., Chiang, C. and Chao, Y. (2017) 'Metabolic engineering of *Escherichia coli* for production of n-butanol from crude glycerol', *Biotechnology for biofuels*, 10(1), pp. 173; 173-173.

Sanjana, N.E., Cong, L., Zhou, Y., Cunniff, M.M., Feng, G. and Zhang, F. (2012) 'A transcription activator-like effector toolbox for genome engineering', *Nature protocols*, 7(1), pp. 171-192.

Sapranaukas, R., Gasiunas, G., Fremaux, C., Barrangou, R., Horvath, P. and Siksnys, V. (2011) 'The *Streptococcus thermophilus* CRISPR/Cas system provides immunity in *Escherichia coli*', *Nucleic acids research*, 39(21), pp. 9275-9282.

Sarma, K., Levasseur, P., Aristarkhov, A. and Lee, J.T. (2010) 'Locked nucleic acids (LNAs) reveal sequence requirements and kinetics of Xist RNA localization to the X chromosome', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(51), pp. 22196-22201.

Shah, S.A. and Garrett, R.A. (2011) 'CRISPR/Cas and Cmr modules, mobility and evolution of adaptive immune systems', *Research in Microbiology*, 162(1), pp. 27-38.

She, Q., Singh, R.K., Confalonieri, F., Zivanovic, Y., Allard, G., Awayez, M.J., Chan-Weiher, C.C.-., Clausen, I.G., Curtis, B.A., De Moors, A., Erauso, G., Fletcher, C., Gordon, P.M.K., Heikamp-de Jong, I., Jeffries, A.C., Kozera, C.J., Medina, N., Peng, X., Thi-Ngoc, H.P., Redder, P., Schenk, M.E., Theriault, C., Tolstrup, N., Charlebois, R.L., Doolittle, W.F., Duguet, M., Gaasterland, T., Garrett, R.A., Ragan, M.A., Sensen, C.W. and Van der Oost, J. (2001) 'The complete genome of the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* P2', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(14), pp. 7835-7840.

Smith, I., Greenside, P.G., Natoli, T., Lahr, D.L., Wadden, D., Tirosh, I., Narayan, R., Root, D.E., Golub, T.R., Subramanian, A. and Doench, J.G. (2017) 'Evaluation of RNAi and CRISPR technologies by large-scale gene expression profiling in the Connectivity Map', *PLoS Biology*, 15(11), pp. e2003213.

- Smithies, O., Smithies, O., Gregg, R.G., Gregg, R.G., Boggs, S.S., Boggs, S.S., Koralewski, M.A., Koralewski, M.A., Kucherlapati, R.S. and Kucherlapati, R.S. (1985) 'Insertion of DNA sequences into the human chromosomal β -globin locus by homologous recombination', *Nature*, 317(6034), pp. 230-234.
- Sternberg, S.H., LaFrance, B., Kaplan, M. and Doudna, J.A. (2015) 'Conformational control of DNA target cleavage by CRISPR-Cas9', *Nature*, 527(7576), pp. 110-113.
- Sternberg, S.H., Redding, S., Jinek, M., Greene, E.C. and Doudna, J.A. (2014) 'DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9', *Nature*, 507(7490), pp. 62-67.
- Stojic, L., Lun, A.T., Mangei, J., Mascalchi, P., Quarantotti, V., Barr, A.R., Bakal, C., Marioni, J.C., Gergely, F. and Odom, D.T. (2018) 'Specificity of RNAi, LNA and CRISPRi as loss-of-function methods in transcriptional analysis', *Nucleic acids research*, 46(12), pp. 5950-5966.
- Sung, L., Wu, M., Lin, M., Hsu, M., Truong, V.A., Shen, C., Tu, Y., Hwang, K., Tu, A., Chang, Y. and Hu, Y. (2019) 'Combining orthogonal CRISPR and CRISPRi systems for genome engineering and metabolic pathway modulation in *Escherichia coli*', *Biotechnology and bioengineering*, 116(5), pp. 1066-1079.
- Tarasava, K., Liu, R., Garst, A. and Gill, R.T. (2018) 'Combinatorial pathway engineering using type I-E CRISPR interference', *Biotechnology and bioengineering*, 115(7), pp. 1878-1883.
- Tufarelli, C., Stanley, J.A.S., Garrick, D., Sharpe, J.A., Ayyub, H., Wood, W.G. and Higgs, D.R. (2003) 'Transcription of antisense RNA leading to gene silencing and methylation as a novel cause of human genetic disease', *Nature genetics*, 34(2), pp. 157-165.
- Vickers, T.A. and Crooke, S.T. (2014) 'Antisense oligonucleotides capable of promoting specific target mRNA reduction via competing RNase H1-dependent and independent mechanisms', *PloS one*, 9(10), pp. e108625.
- Wess, J., Brinek, M. and Boles, E. (2019) 'Improving isobutanol production with the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by successively blocking competing metabolic pathways as well as ethanol and glycerol formation', *BIOTECHNOLOGY FOR BIOFUELS*, 12(1), pp. 173-15.
- Woolston, B.M., Emerson, D.F., Currie, D.H. and Stephanopoulos, G. (2018) 'Rediverting carbon flux in *Clostridium ljungdahlii* using CRISPR interference (CRISPRi)', *Metabolic engineering*, 48(1), pp. 243-253.
- Wright, A.V., Nuñez, J.K. and Doudna, J.A. (2016) 'Biology and Applications of CRISPR Systems: Harnessing Nature's Toolbox for Genome Engineering', *Cell*, 164(1-2), pp. 29.
- Wu, J., Zhou, P., Zhang, X. and Dong, M. (2017) 'Efficient de novo synthesis of resveratrol by metabolically engineered *Escherichia coli*', *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 44(7), pp. 1083-1095.
- Wu, J., Du, G., Chen, J. and Zhou, J. (2015) 'Enhancing flavonoid production by systematically tuning the central metabolic pathways based on a CRISPR interference system in *Escherichia coli*', *Scientific reports*, 5(1), pp. 13477; 13477-13477.
- Wu, J., Liu, P., Fan, Y., Bao, H., Du, G., Zhou, J. and Chen, J. (2013) 'Multivariate modular metabolic engineering of *Escherichia coli* to produce resveratrol from l-tyrosine', *Journal of Biotechnology*, 167(4), pp. 404-411.
- Wu, M., Sung, L., Li, H., Huang, C. and Hu, Y. (2017) 'Combining CRISPR and CRISPRi Systems for Metabolic Engineering of *E. coli* and 1,4-BDO Biosynthesis', *ACS Synthetic Biology*, 6(12), pp. 2350-2361.

- Wurtzel, O., Sapra, R., Chen, F., Zhu, Y., Simmons, B.A. and Sorek, R. (2010) 'A single-base resolution map of an archaeal transcriptome', *Genome research*, 20(1), pp. 133-141.
- Xu, P., Ranganathan, S., Fowler, Z.L., Maranas, C.D. and Koffas, M.A.G. (2011) 'Genome-scale metabolic network modeling results in minimal interventions that cooperatively force carbon flux towards malonyl-CoA', *Metabolic Engineering*, 13(5), pp. 578-587.
- Xue, C., Zhu, Y., Zhang, X., Shin, Y. and Sashital, D.G. (2017) 'Real-Time Observation of Target Search by the CRISPR Surveillance Complex Cascade', *Cell Reports*, 21(13), pp. 3717-3727.
- Yim, H., Haselbeck, R., Niu, W., Pujol-Baxley, C., Burgard, A., Boldt, J., Khandurina, J., Trawick, J.D., Osterhout, R.E., Stephen, R., Estadilla, J., Teisan, S., Schreyer, H.B., Andrae, S., Yang, T.H., Lee, S.Y., Burk, M.J. and Van Dien, S. (2011) 'Metabolic engineering of *Escherichia coli* for direct production of 1,4-butanediol', *Nature Chemical Biology*, 7(7), pp. 445.
- Yosef, I., Goren, M.G. and Qimron, U. (2012) 'Proteins and DNA elements essential for the CRISPR adaptation process in *Escherichia coli*', *Nucleic acids research*, 40(12), pp. 5569-5576.
- Zemanová, M., Kadeřábková, P., Pátek, M., Knoppová, M., Šilar, R. and Nešvera, J. (2008) 'Chromosomally encoded small antisense RNA in *Corynebacterium glutamicum*', *FEMS microbiology letters*, 279(2), pp. 195-201.
- Zhang, F., Carothers, J.M. and Keasling, J.D. (2012) 'Design of a dynamic sensor-regulator system for production of chemicals and fuels derived from fatty acids', *Nature biotechnology*, 30(4), pp. 354-359.
- Zheng, Y., Shen, W., Zhang, J., Yang, B., Liu, Y., Qi, H., Yu, X., Lu, S., Chen, Y., Xu, Y., Li, Y., Gage, F.H., Mi, S. and Yao, J. (2018) 'CRISPR interference-based specific and efficient gene inactivation in the brain', *Nature neuroscience*, 21(3), pp. 447-454.