УДК 615.281:577.1, 577.21, 615.281:577.1, 577.21
№ держреєстрації 0120U104114
Інв. № _____

Національна Академія Наук України
Інститут біології клітини (ІБК)

79005 м. Львів вул. Драгоманова 14/16; тел..(0322)2612163; факс 72-16-48

ЗАТВЕРДЖУЮ
Директор Інституту біології клітини НАН України

_____ Сибірний А.А..

«14» грудня 2021 р.

ЗВІТ
про науково-дослідну роботу
за договорами від 27.10.2020 р. № 54/01.2020
від 30.04.2021 р. № 95/01/0090

СТВОРЕННЯ ДРІЖДЖОВИХ ПРОДУЦЕНТІВ НОВИХ ФЛАВІНОВИХ АНТИБІОТИКІВ

грантова підтримка «Національного фонду досліджень України»
у межах конкурсу «Наука для безпеки людини та суспільства»

(заключний)

Науковий керівник НДР
д.б.н., с.н.с. _____ К.В. Дмитрук

2021

Результати роботи розглянуто Вченою Радою ІБК НАН України», протокол від 14 грудня 2021 р. № 13

СПИСОК АВТОРІВ

Керівник НДР,

заступник директора з наукової роботи

ст. наук. співроб.,д-р біол. наук _____ К.В. Дмитрук

підпис (аналітичний огляд, розділ 3.15)

дата 14.12.2021

Виконавці :

директор, д-р біол. наук, професор,

акад. НАН України _____ А.А. Сибірний

підпис (вступ, висновки)

дата 14.12.2021

пр.наук. співроб., д-р біол. наук,

професор _____ Д.В. Федорович

підпис (реферат, розділи 3.5, 3.6, 3.7)

дата 14.12.2021

наук. співроб., канд. біол. наук _____ Л.Р. Фаюра

підпис (розділи 3.12, 3.13, 3.14)

дата 14.12.2021

наук. співроб., канд. біол. наук _____ О.В. Дмитрук

підпис (розділи 3.8, 3.9, 3.10, 3.11)

дата 14.12.2021.

аспірант _____ Ю.А. Андреєва

підпис (розділи 3.1, 3.2, 3.3, 3.4)

дата 15.12.2021

аспірант _____ Я.О. Петровська

підпис (розділ 2)

дата 14.12.2021

РЕФЕРАТ

Звіт про НДР: 86 с., 47 рис., 54 джерело.

Об'єкт дослідження: процес біосинтезу амінорибофлавіну та розеофлавнуз рибофлавіну та флавінмононуклеотиду.

Мета дослідження: конструювання рекомбінантних штамів дріжджів *Candida famata,* здатних до надпродукції антибіотиків амінорибофлавіну та розеофлавіну.

Методи дослідження: генно-інженерні, мікробіологічні, біохімічні, біоінформатичного аналізу.

Розроблено систему мультикопійної інтеграції цільових послідовностей ДНК в геном дріжджів *Candida famata*, оптимізовано CRISPR-Cas9 систему для *C. famata,* проведено дизайн генів *rosB, rosA* та та *rosC S. davaonensis,* сконструйовано плазміди для мультикопійної інтеграції, що містять адаптовані гени *rosB, rosA* та *rosC* під контролем сильного промотора. Отримані плазміди були використані для селекції штамів дріжджів *C. famata* з посиленою експресією відповідних генів. Сконструйовано продуцент амінорибофлавіну на основі дріжджів *C. famata* здатний до надсинтезу ФМН шляхом посилення експресії гена *rosB.* Хроматографічний та масспектрометричний аналіз виявив амінорибофлавін, що нагромаджував рекомбінантний штам у культуральному середовищі у концентрації 5,2 мг/л. Сконструйовано штам *Pichia pastoris* з посиленою експресією генів *FMN1, rosB, rosA* та *rosC* здатний до продукції розеофлавіну у концентрації 3 мг/л. Розроблено схему виділення та очищення амінорибофлавіну та розеофлавіну з культуральної рідини сконструйованих штамів та отримано препаративні кількості цих антибіотиків. Підібрано умови культивування для сконструйованих штамів для максимального нагромадження цих антибіотиків. Оптимізовано умови культивування продуцента розеофлавіну у ферментері. За умов культивування у лабораторному ферментері об'ємом 1 л, рекомбінантний штам *P. pastoris* продукував 46 мг/л розеофлавіну.

Ключові слова: генна інженерія, дріжджі, *Candida famata*, *Pichia pastoris* розеофлавін, амінорибофлавін, *Streptomyces davaonensis*, гени *FMN1*, *rosB*, *rosA*, *rosC.*

ABSTRACT

Report: 86 pages, 47 figures, 54 sources.

Object of research: the process of biosynthesis of aminoriboflavin and roseoflavin from riboflavin and flavin mononucleotide.

The purpose of the study: construction of recombinant strains of yeast *Candida famata*, capable of overproduction of antibiotics aminoriboflavin and roseoflavin.

Research methods: genetic engineering, microbiological, biochemical, bioinformatics analysis.

A system of multicopy integration of target DNA sequences into the genome of yeast *Candida famata* has been developed, CRISPR-Cas9 system for *C. famata* has been optimized, *rosB, rosA* and *rosC* genes of *S. davaonensis* were designed, plasmids for multicopy integration of *rosB, rosA* and *rosC* genes under the control of a strong promoter has been constructed. The constructed plasmids were used for selection of *C. famata* yeast strains with enhanced expression of the corresponding genes.

An aminoriboflavin producer based on the yeast *C. famata* able to oversynthesis of FMN by overexpression of *rosB* gene has been constructed. Chromatographic and mass spectrometric analysis revealed aminoriboflavin, which accumulated recombinant strain in culture medium at a concentration of 5.2 mg/l. The *Pichia pastoris* strain with increased expression of *FMN1, rosB, rosA* and *rosC* genes was constructed. The engineered strain produced 3 mg/l of roseoflavin.

The scheme of isolation and purification of aminoriboflavin and roseoflavin from the culture medium of the constructed strains was developed and preparative amounts of these antibiotics were obtained. Cultivation conditions were optimized to maximize the accumulation of these antibiotics by the constructed strains. The conditions for culturing the roseoflavin producer in a bioreactor have been optimized. The recombinant P. pastoris strain produced 46 mg/L of roseoflavin during cultivation in a 1 L laboratory bioreactor.

Key words: genetic engineering, yeast, *Candida famata, Pichia pastoris*, roseoflavin, aminoriboflavin, *Streptomyces davaonensis, FMN1, rosB, rosA, rosC*.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ 7
ВСТУП 8
1. АНАЛІТИЧНИЙ ОГЛЯД 10
1.1. Розеофлавін: продуценти, біосинтез та механізм дії 10
1.2. Підходи до конструювання продуцентів флавінових антибіотиків 13
1.3. Молекулярні інструменти для інженерії *C. famata* як продуцента Рибофлавіну 16
2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ 19
2.1. Штами, середовища, умови культивування 19
2.2. Рестрикційний аналіз ДНК 20
2.3. Електрофорез ДНК в агарозному гелі 20
2.4. Виділення плазмідної ДНК з клітин *E.coli* 20
2.5. Лігування фрагментів ДНК 21
2.6. Електротрансформація клітин *E. coli* 22
2.7. Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) 22
2.8. Асамблея Гібсона 23
2.9. Електротрансформація клітин *C. famata* 23
2.10. Довготривале зберігання бактерійних та дріжджових трансформантів 24
2.11. Програмне забезпечення для пошуку та аналізу нуклеотидних та амінокислотних послідовностей 24
2.12. Аналіз флавінів 25
2.13. Мас-спектрометрія (МС) 25
2.14. ВЕРХ (HPLC) та РХ-МС (LC-MS) аналізи 25
3.РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ 27
3.1. Розробка системи мультикопійної інтеграції для *Candida famata* 27
3.2. Оптимізація CRISPR-Cas9 системи для *C. famata* 28
3.3. Адаптація послідовностей генів генів *rosB* та *rosA S. davaonensis* для експресії в геномі дріжджів *C. famata* 32
3.4. Конструювання плазмід для посилення експресії генів *FMN1*,

rosB та *rosA* 33
3.5. Конструювання продуцентів АФ на основі дріжджів *C. famata* 39
3.6. Ідентифікація АФ 42
3.7. Конструювання продуцентів РоФ на основі дріжджів *C. famata* 45
3.8. Клонування гена *rosC* для експресії у дріжджів *C. famata* 50
3.9. Генетична та біохімічна характеристика штамів *C. famata* з посиленою експресією генів *FMN1, rosB, rosA* та *rosC* 52
3.10. Клонування гена *rosC* для експресії у дріжджів *P. pastoris* 56
3.11. Отримання трансформантів дріжджів *P. pastoris* з посиленою експресією гена *rosC* та їх аналіз 59
3.12. Розробка схеми розділення флавінів та очищення АФ з культуральної рідини штаму - продуцента АФ *C. famata* 62
3.13. Розробка схеми розділення флавінів та очищення РоФ з культуральної рідини штаму *P. pastoris* що містить надекспресовані гени *FMN1, rosA, rosB, rosC* 68
3.13. Дослідження продукції РоФ штамами трансформантами дріжджів *C. famata FMN1/rosA/rosB/rosC* 72
3.15. Дослідження кінетику росту, синтезу та продуктивності РоФ у трансформантів дріжджів *P. pastoris FMN1/rosA/rosB/rosC* на різних джерелах вуглецю за різних умов інкубації 74
ВИСНОВКИ 80
ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ 81

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АТФ – аденозин-5’-трифосфат

АФ – амінорибофлавін

ВЕРХ – високоефективна рідинна хроматографія

ВРТ – відкрита рамка трансляції

ЕДТА – етилендиамінтетраацетат, динатрієва сіль

ІМФ – інозинмонофосфат

МС - мас-спектрометрія

МО – міжнародні одиниці

п.н. – пар нуклеотидів

РоФ – розеофлавін

РФ – рибофлавін

ФМН – флавінмононуклеотид

OD – оптична густина

MRSA – метицилінрезистентний штамам *S. aureus*

SAM – S-аденозилметіонін

SDS – додецилсульфат натрію

YNB – yeast nitrogen base

ВСТУП

Незважаючи на успіхи в модифікації природних та синтетичних молекул антибіотиків, потреба в антибактеріальних препаратах постійна, оскільки це основна зброя проти бактеріальних інфекцій. Інфекційні хвороби спричинили близько 1/5 загальної щорічної кількості смертей у світі у 2017 році [Ritchie and Roser, 2020]. Новим викликом людству стало епідемічне поширення вірусної інфекції, спричиненої SARS-CoV2. Більшість летальних випадків викликаніі вторинними бактерійними інфекціями [Zhou et al., 2020]. Розвитку нозокоміальних (внутрішньолікарняних) інфекцій сприяє також підключення пацієнтів до апаратів штучної вентиляції легень [Cox et al., 2020]. Практично всі серйозні випадки COVID-19 лікують за допомогою антибіотиків. Однак, масштабне, нераціональне їх застосування без належного визначення чутливості мікроорганізмів до антимікробних препаратів призводить до поширення збудників, стійких до антибіотиків, в тому числі нозокоміальних інфекцій. Проблема стійкості мікроорганізмів до антибіотиків набула світового масштабу. Частка нозокоміальних інфекції, які викликаються умовно-патогенними бактеріями, включаючи метицилін-резистентні *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Streptococcus pneumoniae, Enterococcus faecalis, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Haemophilus influenzae, Pseudomonas aeruginosa, Legionella pneumoniae, Acinetobacter baumannii* та ін., становить близько 85%. Пошук нових антибіотиків, а також створення відповідних продуцентів, є одними з головних завдань сучасної молекулярної генетики, біотехнології та медицини. Ко-інфекції COVID-19, спричинені метицилінрезистентними штамами *S. aureus* (MRSA) та іншими грам-позитивними бактеріями, складно піддаються лікуванню та викликають серйозне занепокоєння у медиків. Відомо, що MRSA викликає пневмонію, зараження крові та післяопераційні інфекції, які без швидкого та якісного лікування призводять до сепсиса та смерті. MRSA стійкі до багатьох антибіотиків, тому розробка нових високоефективних препаратів є актуальним та важливим завданням.

Структурні аналоги вітаміну B_2, зокрема розеофлавін та його попередник – амінорибофлавін, є надійними засобами проти бактерій з множинною стійкістю до антибіотиків. Їх використання обмежене синтезом у незначних кількостях. Розеофлавін є природнім аналогом рибофлавіну (вітамін B_2), що продукується бактеріями *Streptomyces davaonensis*. Амінорибофлавін та розеофлавін потрапляють у клітини бактерій через транспортні системи рибофлавіну та перетворюються на структурні аналоги флавінового кофермента флавінмононуклеотиду (ФМН), які з високою афінністю зв'язуються зі специфічним бактерійним генетичним регуляторним елементом riboswitch, що блокує біосинтез та транспорт рибофлавіну, і як результат, загибель клітини. Аналоги флавінових коферментів також призводять до інгібування флавінзалежних ферментів, що спричиняє загибель клітин. На сьогоднішній день розеофлавін виробляється виключно за допомогою хімічного синтезу, присутній на ринку у незначних кількостях та використовується лише для наукових цілей. Ціна його 20-30 €/мг. Тоді як амінорибофлавін комерційно не виробляється взагалі. Природнім продуцентом розеофлавіну є грампозитивні бактерії *Streptomyces davawensis.* Особливості міцелійного росту *S. davaonensis* та низька продукція розеофлавіну накладає значні обмеження у промисловому виробництві цього антибіотика. Найоптимальнішим вихідним організмом для створення продуцентів флавінових антибіотиків є дріжджі, оскільки в них відсутня riboswitch-залежна система регуляції синтезу рибофлавіну, вони ростуть на простих живильних середовищах, не чутливі до фагової інфекції. Завдання даного етапу полягало в отриманні колекції штамів дріжджів *Candida famata* з посиленою експресією генів *FMN1, rosB, rosA* з подальшим підтвердженням здатності селекціонованих штамів продукувати флавінові антибіотики (АФ та РоФ).

1. АНАЛІТИЧНИЙ ОГЛЯД

1.1. Розеофлавін: продуценти, біосинтез та механізм дії

Розеофлавін (РоФ, 8-деметил-8-диметиламіно-рибофлавін) є природнім аналогом рибофлавіну (РФ, вітамін В2), що продукується грам-позитивними бактеріями *Streptomyces davaonensis.* Це перспективний антибіотик широко спектру дії, що може бути використаний для лікування інфекцій, в тому числі, спричинених MRSA. Для пригнічення росту MRSA, РоФ виявляє приблизно в 17 разів нижчу мінімальну токсичну концентрацію ніж лінезолід. Встановлено також ефективність РоФ проти MRSA інфекції на мишачих моделях [Wang et al., 2017]. Всі бактерії, які здатні до поглинання РоФ, є чутливими до цього антибіотика [Pedrolli et al., 2013, 2014]. Поглинання РоФ здійснюється за участю транспортерів РФ [Gutierrez-Preciado et al., 2015]. РоФ як антимікробному агенту присвячено низку статей [Otani et al., 1980; Lee et al., 2009, Howe et al., 2015; Wang et al., 2017]. Він пригнічує ріст бактерії *Staphylococcus aureus* (МІК 1,25 μг/мл) [Otani et al., 1980], *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes* [Wang et al., 2017], *Listeria monocytogenes* (МІК 0,5 мкг/мл) [Mansjo, Johansson, 2011; Matern et al., 2016], а також протозоа *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* and *Leishmania mexicana* [Krajewski et al., 2017]. РоФ є дієвим препаратом лікування кокцидіозу, захворювання, що викликається найпростішими та вражає сільськогосподарських тварин та птицю [Graham and Rogers, 1979]. Фермерські господарства зазнають величезних збитків від цього захворювання Встановлено, що РоФ у великих дозах не шкодить птахам.

РоФ та його біосинтетичний попередник амінорибофлавін (АФ) перетворюються на структурні аналоги флавінового кофермента ФМН, які з високою афінністю зв'язуються зі специфічним бактерійним генетичним регуляторним елементом riboswitch, що блокує біосинтез та транспорт рибофлавіну, і як результат, загибель клітини. Аналоги флавінових коферментів ФМН та ФАД також призводять до інгібування флавінзалежних ферментів і загибелі клітин. Важливо відзначити, що АФ є не токсичним для клітин ссавців [Pedrolli et al., 2014], оскільки людський фермент ФАД-синтетаза не взаємодіє з

АміноФМН [Pedrolli et al., 2011]. Це робить АФ надзвичайно перспективним антибактеріальним препаратом.

Шлях біосинтезу РоФ у бактерій *S. davawensis* було ідентифіковано групою німецьких вчених після визначення нуклеотидної послідовності геному цього виду стрептоміцетів [Jankowitsch et al., 2011; Grill et al., 2008; Schwarz et al., 2016]. Синтез РоФ починається з РФ, який зазнає фосфорилювання рибофлавінкіназою, що кодується геном *ribC*. У наступній реакції, яку каталізує RosB, формується 8-диметил-8-формілрибофлавін-5'-фосфат. Ця реакція відбувається за наявності кисню. RosB каталізує наступну конверсію 8-диметил-8-формілрибофлавін-5'-фосфату до 8-диметил-8-карбоксирибофлавін-5'-фосфату. У цій реакції як кофактор виступає тіамін. Третю реакцію каталізує той самий білок RosB та забезпечує перетворення 8-диметил-8-карбоксирибофлавін-5-фосфату до 8-диметил-8-амінорибофлавін-5'-фосфату. У даній реакції як кофактор також виступає тіамін. Реакція потребує наявності глутамату, і спряжена з утворенням 2-оксоглутарату. Під час цієї реакції відбувається декарбоксилювання з наступним трансамінуванням 8-диметил-8-карбоксирибофлавін-5'-фосфату. Дефосфирилювання 8-диметил-8-амінорибофлавін-5'-фосфату до 8-диметил-8-амінорибофлавіну відбувається за участі неідентифікованої фосфатази. Висувається припущення, що дану реакцію може каталізувати неспецифічна фосфатаза. Останні дві реакції біосинтезу РоФ каталізує специфічна диметилтрансфераза RosA. 8-диметил-8-амінорибофлавіну зазнає метилювання амінної групи із залученням S-аденозилметіоніну. В результаті реакції формується РоФ та S-аденозилгомоцистеїн (Рис. 1.1).

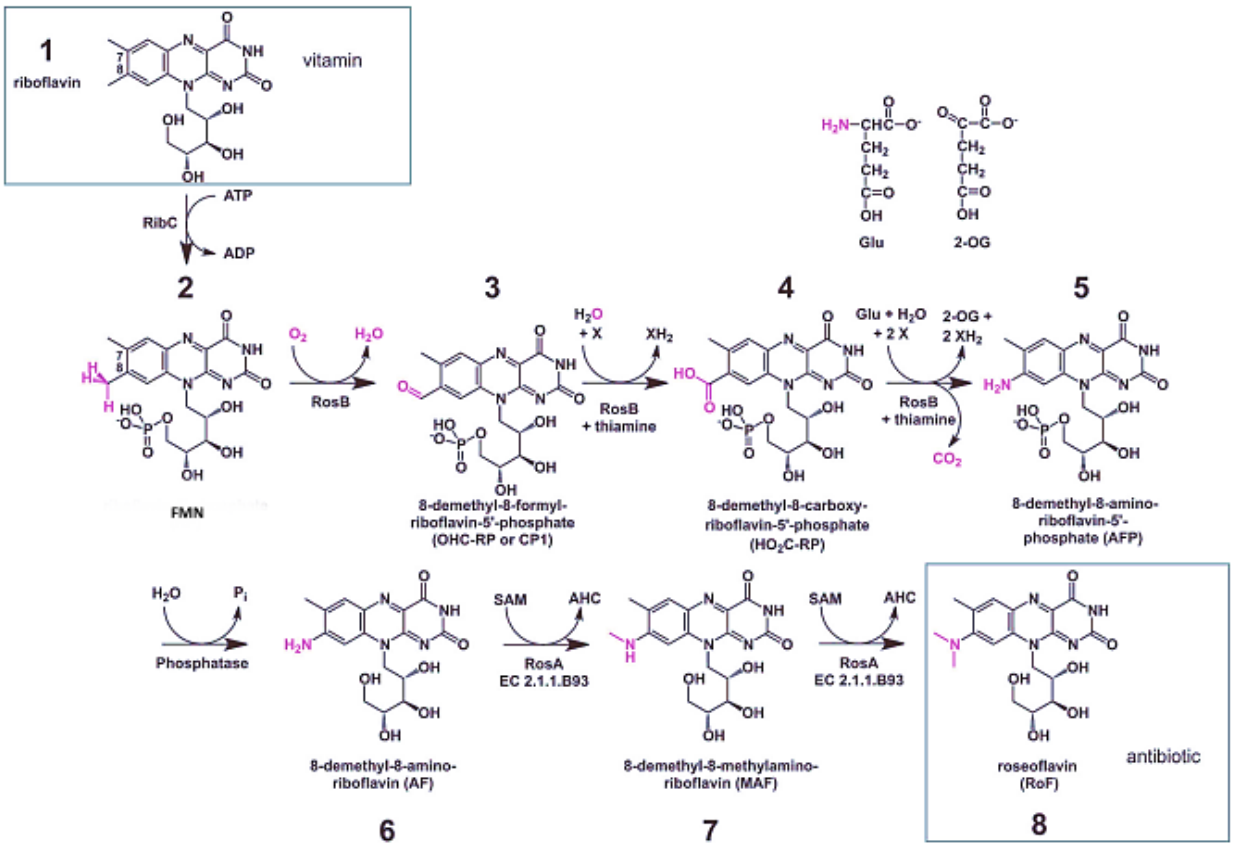


Рис. 1.1 Шлях біосинтезу розеофлавіну у бактерій *S. davawensis*.

FMN (флавінмононуклеотид) (2) утворюється з рибофлавіну та АТФ за участі рибофлавінкінази RibC. Перша реакція, яку каталізує RosB, веде до перетворення FMN в OHC-RP або CP1 (3) та відбувається лише за наявності кисню. Перетворення OHC-RP в HO 2 C-RP (4) залежить від тіаміну, при цьому кисень не використовується. HO 2 C-RP за участі RosB зазнає декарбоксилювання та трансамінування до амінорибофлавін-фосфату (АФР) (5) у присутності тіаміну та глутамату при супутньому синтезі 2-оксоглутарату (2-OG). Ця реакція відбувається і при нестачі кисню. SAM-залежна диметилтрансфераза RosA відповідає за перетворення АФ в РоФ (через MAF). В цій реакції, як побічний продукт утворюється S-аденозилгомоцистеїн (AHC). Зокрема, АФ не є субстратом для RosA. Дефосфорилювання АФ здійснюється специфічною фосфатазою RosC [Schneider et al., 2020].

На сьогоднішній день РоФ виробляється виключно за допомогою хімічного синтезу та присутній на ринку у міліграмових кількостях з вартістю близько 25

€/мг, що накладає обмеження у його використанні. Тоді як АФ комерційно не виробляється взагалі.

Грам-позитивні бактерії *Streptomyces davaonensis* (раніше відомі як *Streptomyces davawensis*) і *Streptomyces cinnabarinus* є природніми продуцентами РоФ і активно екскретують його за участю транспортера РФ [Hemberger et al., 2011; Jankowitsch et al., 2012, . Landwehr et al., 2018]. Однак рівні продукції є низькими, а міцелійний ріст створює труднощі для промислового виробництва флавінових антибіотиків. Конструювання рекомбінантних штамів дріжджів, здатних до надсинтезу РоФ та АФ дозволить забезпечити достатні кількості цих перспективних антибактеріальних препаратів для їх широкого застосування у медицині.

1.2. Підходи до конструювання продуцентів флавінових антибіотиків

Штам дикого типу *S. davaonensis* утворює до 20 μM РоФ [Jankowitsch et al., 2012]. Важливо відзначити, що існування продуцентів АФ у літературі не описано взагалі. Експресія генів біосинтезу РоФ з *S. davaonensis rosB, rosA* і гена *RFK* (кодує рибофлавін кіназу) в *Corynobacterium glutamicum* і *S. davaonensis* привела до зростання продукції РоФ рекомбінантними штамами до 1,6±0,2 μM (0,7 mг/лl) і 34,9±5,2 μM (14 мг/л), відповідно. Вихід РоФл у *S. davaonensis* зріс на 78 % [Mora-Lugo et al., 2019]. При цьому надпродукція РоФл не приводила до пригнічення росту *S. davaonensis*, оскільки ця бактерія містить нечутливий до РоФ ФМН riboswitch [Pedrolli et al., 2012]. Особливості міцелійного росту *S. davaonensis* та низька продукція РоФл накладає значні обмеження у промисловому виробництві цього антибіотика. та створенні промислових продуцентів флавінових антибіотиків. Найоптимальнішим вихідним організмом для цієї мети є дріжджі, які мають суттєві переваги перед актинобактеріями *S. davaonensis*, оскільки в них відсутня riboswitch-залежна система регуляції синтезу РФ. Більше того, дріжджі характеризуються порівняно швидким ростом, здатні накопичувати високу біомасу, не чутливі до фагової інфекції та для їх культивування використовують дешеві поживні середовищі. Оскільки синтез

флавінових антибіотиків починається з РФ, як вихідний організм доцільно використовувати флавіногенні дріжджі, здатні до надпродукції цього вітаміну. Низка видів дріжджів, зокрема *Candida famata* є природніми продуцентами РФ, що є попередником АФ та РоФ. За продукцією РоФ сконструйовані штами *C. famata* повинні переважати наявний рекомбінантний продуцент цієї сполуки на основі *S. davaonensis* [Mora-Lugo et al., 2019], а також дріжджовий продуцент РоФ на основі *Komagatella phaffii*, сконструйований у нашій попередній роботі. Гомологічний ген *FMN1* та гени *rosB, rosA S. davaonensis* були введені в геном рекомбінантного штаму *K. phaffii* X-33 PRC RIB1+3+7+5+2+4 (X-RF) з посиленою експресією всіх структурних генів біосинтезу РФ [Marx et al., 2008]. Цей штам продукував близько 170 мг РФ/л у ферментері, що значно поступається рекомбінантним штамам *C. famata*, продукції РФ якими сягає майже 3 г/л при культивуванні у колбах [Dmytruk et al., 2020]. Експресію цільових генів було посилено шляхом їх поміщення під контроль сильних конститутивних промоторів генів *GAP1* та *TEF1* (кодує гліцеральдегідфосфатдегідрогеназу та трансляційний фактор елонгації 1A). У результаті сконструйований штам YRF/FMN1/rosB/rosA продукував 46 мг РоФ/л у ферментері, тоді як рекомбінантний штам *S. davaonensis* з посиленою експресією генів *rosB* та *rosA* продукував РоФ в 3,3 раза менше, сягаючи 14 мг/л (Рис.) [(Mora-Lugo et al. 2019]. Отримані результати переконливо свідчать, що використання більш продуктивного дріжджового продуцента РФ дозволить значно підвищити продукцію РоФ.

Створення штамів дріжджів, які продукуватимуть АФ та РоФ, необхідно розпочинати з конструювання плазмід, що містять відповідні гени rosB та rosA *S. davawensis*. Відомо, що геном *S. davonensis* характеризується високим вмістом Г-Ц пар (70,6%) [Jankowitsch et al., 2012]. Це може перешкоджати ефективній гетерологічній експресії відповідних генів. Для досягнення надпродукції АФ та РоФ, додатково до *rosB* та *rosA*, також необхідно посилити експресію гомологічного гена *FMN1,* що кодує рибофлавінкіназу та каталізує перетворення рибофлавіну в ФМН.

При створенні стабільних дріжджових продуцентів цільових сполук більш оптимальним є використання модулів експресії, інтегрованих в геном реципієнта. Вищий рівень експресії досягається шляхом множинної інтеграції модулів експресії у відповідних локусах ДНК. Розробка системи мультикопійної інтеграції для *C. famata* буде розпочато з пошуку послідовностей, що зустрічаються в геномі у багатьох копіях. Найчастіше для даної мети використовують послідовності генів рРНК, що будуть слугувати мішенями для множинної інтеграції касет шляхом гомологічної рекомбінації. Як домінантні селективні маркери буде використано гени *nat1* та *ble*, що забезпечують резистентність до антибіотиків норзеотрицину та флеоміцину, відповідно. Домінантні маркери разом з репортерним геном *LAC4* або *GFP* будуть фланковані відповідними послідовностями генів рРНК та використані для розробки системи мультикопійної інтеграції шляхом селекції та аналізу відповідних трансформантів на середовищі з підвищеними концентраціями норзеотрицину та/або флеоміцину. Для створення продуцентів флавінових антибіотиків на основі наявних продуцентів РФ необхідні вільні селективні маркерів. Для вилучення маркерів з геному рекомбінантних продуцентів РФ необхідно оптимізувати метод CRISPR-Cas9 редагування геномів. У нашій попередній роботі цей метод було розроблено, однак ефективність редагування була недостатньо високою [Lyzak et al., 2016]. Ефективність методу буде підвищено шляхом заміни промотора гена Cas9 на сильний конститутивний промотор гена *TEF1 C. famata*. Використння CRISPR-Cas9 дозволить отримати продуценти РФ з вільними селективними маркерами, які буде використано як реципієнти у подальшій роботі. Дріжджі *C. famata* належать до CUG-клайду дріжджів, в яких триплет CUG кодує серин, тоді як у більшості організмів цей триплет кодує лейцин. Відомо, що геном *S. davaonensis* характеризується високим вмістом Г-Ц пар (70,6%) [Jankowitsch et al., 2012]. Що також може перешкоджати ефективній гетерологічній експресії відповідних генів у *C. famata*, геном якого містить значно меншу кількість Г-Ц пар (~35,4%). Тому необхідно провести дизайн генів rosB, rosA *S. davaonensis* з врахуванням

особливостей кодування та синтезувати їх. Ця підготовча робота дозволить сконструювати серію плазмід, що міститимуть гомологічний ген *FMN1* та адаптовані версії генів *rosB* та/або *rosA S. davaonensis* під контролем сильного конститутивного промотора гена *TEF1*, що кодує трансляційний фактор елонгації 1A, селективні маркери, що забезпечує стійкість до антибіотиків (норзеотрицин та флеоміцин) та послідовність генів рРНК для забезпечення мультикопійної інтеграції. Для з'єднання усіх компонентів експресійних касет необхідно застосувати методологію Golden Gate або Gibson Assembly. Сконструйовані плазміди будуть введені в геном штамів-надсинтетиків РФ *C. famata* шляхом трансформації [Voronovsky et al., 2002]. Селекцію відповідних дріжджових трансформантів на підвищених концентраціях антибіотиків з подальшим їх перенесенням на вищі концентрації селективних агентів. Рожеве забарвлення РоФ дозволяє оцінити рівень його продукції за кольором колоній. Наявність цільових послідовностей ДНК в геномі трансформантів буде підтверджено за допомогою ПЛР, а для підтвердження мультикопійної інтеграції цільових генів *FMN1, rosB, rosA* необхідно використати ПЛР у реальному часі (qRT-PCR). Для досягненні поставленої мети необхідно розробити додаткові базові молекулярна методи для дріжджів *C. famata*. Зокрема опрацювати методи мультикопійної інтеграції цільових послідовностей в геном реципієнта, а також метод CRISPR-Cas9 редагування геномів

1.3. Молекулярні інструменти для інженерії *C. famata* як продуцента рибофлавіну

C. famata належить до групи так званих «флавіногенних» організмів, у яких продукція РФ, за умов дефіциту заліза, підвищується від кількох разів до кількох сотень разів. [Tanner et al., 1945; Abbas et al., 2006; Abbas, Sibirny, 2012].

Було декілька спроб пояснити причини такого стимулювання синтезу РФ, включаючи його роль як донора для відновлення заліза чи як кофактора внутрішньо- та зовнішньоклітинних ферментів. Також, було висловлено

припущення, що у флавіногенних дріжджів, РФ залучений у асиміляцію заліза (Fe^{3+}), наприклад, шляхом неферментативного відновлення Fe^{3+} до більш розчинного Fe^{2+}. Проте до цього причини виникнення надсинтезу РФ та фізіологічна роль цього процесу залишаються не з'ясованими. Шляхом використання класичних методів генетики було отримано штами дріжджів *C. famata*, здатні до надсинтезу РФ при високому вмісті заліза в середовищі вирощування, які протягом тривалого часу використовувались для промислового виробництва РФ [Abbas, Sibirny, 2012]. Недоліком цих штамів була їх нестабільність і з часом виробництво РФ за допомогою дріжджів було припинене.

Прогрес у розробці молекулярних методів для *C. famata* розпочався у 2002 році з розробки трансформації на основі штаму *C. famata* L20105 (*leu2*, NRRLY-30292), дефіцитного за β-ізопропілмалат дегідрогеназою та векторми, що містять ген *LEU2 S. cerevisiae* як селективний маркер [Voronovsky et al., 2002; Abbas, Sibirny, 2012]. ARS-елемент *C. famata* було клоновано. У результаті сконструйовано реплікативну плазміду, що забезпечує ефективну трансформацію цих дріжджів. Перша колекція *C. famata* РФ ауксотрофів була генерована шляхом конвенційного мутагенезу. Біохімічна ідентифікація мутантів була заснована на ідентифікації акумульованих інтермедіатів на шляху синтезу РФ у культуральній рідині. Нарешті, гени *RIB1* (кодує ГТФ-циклогідролазу II), *RIB2* (специфічна редуктаза), *RIB5* (диметилрибітилмазин синтаза), *RIB6* (дигідроксибутанонфосфат синтаза), *RIB7* (рибофлавінсинтаза) були клоновані шляхом функціональної комплементації як фрагменти ДНК з бібліотеки генів відповідних мутацій штамів, дефектних за синтезом РФ [Abbas, Sibirny, 2012; Dmytruk et al., 2004].

Інсерційний мутагенез пристосований для технік, що забезпечують значне покращення процедури клонування та ідентифікації генів-мішеней. Метод розроблено для *C. famata*. Інсерційний мутагенез було успішно застосовано для ідентифікації генів *MET2* (гомосерин О-ацетилтрансфераза) та *SEF1*

(транскрипційний регуляторний фактор), залучені в позитивну регуляцію синтезу РФ [Dmytruk et al., 2006].

Ефективні маніпуляції з промисловими продуцентами РФ вимагають домінуючих селективних маркерів. Було складно ідентифікувати та використовувати маркери резистентності до антибіотиків. Частково це пояснюється тому, що у *C. famata* реалізується генетичний код неконвенційних дріжджів, як і в *Debaryomyces hansenii*, де ЦУГ кодує серин рідше, ніж лейцин [Fitzpatricket al., 2006]. Хоча й ЦУГ, зазвичай, не використовується *C. famata*, його часто використовують в бактеріальних генах, які кодують багато популярних маркерів стійкості до антибіотиків. Не зважаючи на факт, що *C. famata* резистентні до більшості антибіотиків, домінуючі селективні маркери для трансформації цього виду дріжджів, такі як ген *ble* зі *Staphylococcus aureus* (що не містить кодона ЦУГ) забезпечують резистентність до антибіотика флеоміцину [Dmytruk et al., 2006].

Негомологічна інтеграція в *C. famata* є набагато частішим явищем аніж сайт-специфічна інтеграція, що ускладнює процес отримання специфічних делецій.

Для *C. famata* розроблено молекулярні методи роботи, зокрема, опрацьовано протоколи трансформації [Voronovsky et al., 2002], методи інсерційного мутагенезу [Dmytruk et al., 2006], розроблено репортерну систему, ідентифіковано сильні конститутивні та регульовані промотори [Ishchuk et al., 2008], клоновано структурні та деякі регуляторні гени синтезу РФ [Dmytruk and Sibirny, 2012], а також експортер цього вітаміну [Tsyrulnyk et al., 2020; 2021]. За допомогою поєднання підходів класичної селекції та методів метаболічної інженерії, включаючи посилення експресії структурних та регуляторних генів, гена, що відповідає за екскрецію вітаміну B_2, а також генів, залучених у синтез ГТФ (попередник синтезу РФ), створено ефективні продуценти РФ [Dmytruk et al., 2011; Dmytruk et al., 2020] і його похідних (ФМН та ФАД) [Yatsyshyn et al., 2009; 2014; Fedorovych et al., 2021]. Таким чином, використання дріжджових суперпродуцентів РФ як вихідної платформи для конструювання штамів, що продукуватимуть флавінові антибіотики (РоФ та АФ) є перспективним підходом.

2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Штами, середовища, умови культивування

В експериментах використовували штам дріжджів *C. famata* L20105 *leu2*.

Бактерійний штам *Escherichia coli* DH5α (*Φ80dlacZΔM15, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17*(r_K^-, m_K^+), *supE44, relA1, deoR, Δ(lacZYA-argF)U169*) використовувався для ампліфікації плазмід. Клітини DH5α вирощували при 37ºС на багатому середовищі Лурія-Бертані (LB: 0,5% дріжджовий екстракт, 1% пептон, 1% NaCl). Для селекції плазмідовмісних бактерій використовували ампіцилін у концентрації 100 мг/мл.

Дріжджі вирощували при температурі 30ºС у напівсинтетичному середовищі: YNB (Yeast Nitrogen Base – мінімальне середовище) у кількості 1,7 г/л з додаванням сульфату амонію (5 г/л) та джерелом вуглецю (2 %), або у багатому середовищі YPD (1 % дріжджовий екстракт, 1 % пептон, 2 % джерело вуглецю: глюкоза або метанол).

Клітини дріжджів вирощували у пробірках об'ємом 20 мл, що містили 2 мл середовища, колбах Ерленмейєра на 300 мл, що містили 100 мл середовища у повітряному шейкері-інкубаторі Inkubator 1000 виробництва Heidolph (Швабах, Німеччина) та на чашках Петрі з 25 мл агаризованого середовища в термостаті при 30ºС.

Кількісні визначення. Біомасу клітин визначали турбідиметрично при 590 нм; суху вагу вираховували за допомогою відповідних калібрувальних кривих.

У роботі було використано наступні молекулярно-генетичні методи: виділення сумарної ДНК з клітин *E. coli*, виділення плазмідної ДНК, підготовка та трансформація компетентних клітин *E. coli*, електрофорез ДНК в агарозному гелі, елюція фрагментів ДНК з агарозного гелю, розщеплення ДНК ендонуклеазами рестрикції, дефосфорилювання «липких» кінців ДНК, лігування лінеаризованих фрагментів ДНК, ампліфікація фрагментів ДНК за допомогою полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Очистку ДНК проводили на колонках фірми «Quiagen» (США) (Quiagen PCR purification Kit). Ампліфікацію фрагментів ДНК здійснювали за допомогою синтетичних олігонуклеотидних

праймерів фірм « Genomed» (Польща) на ампліфікаторі GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems, США) [Johnston, 1994].

2.2. Рестрикційний аналіз ДНК [Маниатис, 1984].

Метод базується на здатності ендонуклеаз рестрикції II класу гідролізувати ДНК в певних сайтах (послідовностях нуклеотидів). В роботі використовували ферменти та відповідні інкубаційні буфери виробництва фірми “Fermentas” (Литва).У реакційну суміш вносили 0,5-2 мкг аналізованої ДНК в ТЕ-буфері чи бідистильованій воді. До розчину ДНК додавали 2 мкл (1/10 об’єму) відповідного буферу і 1 U ферменту на 1мкг плазмідної ДНК, реакційну суміш доводили водою до 20 мкл. Суміш інкубували при 37^{o}С 1-2 години.

2.3. Електрофорез ДНК в агарозному гелі [Маниатис, 1984]

Реактиви: агароза, ТАЕ буфер: 0,04 М тріс-ацетат, 0,002 М ЕДТА, буфер для нанесення проб: 0,25% бромфеноловий синій, 40% сахароза, бромистий етидій 0,5 мкг/мл. Агарозу вносять в ТАЕ буфер, нагрівають до повного розчинення і кип'ятять протягом 3 хв. Коли розчин охолоджується до 50^{o}С, додають бромистий етидій. Охолоджений розчин заливають у кювету з гребінцем для формування лунок. Необхідно, щоб між дном кювети і гребінцем залишався шар агарози товщиною 0,5-1 мм. Після полімеризації гелю гребінець видаляють, а кювету з гелем поміщають в електрофоретичну камеру з електрофорезним буфером. В лунки вносять виділену ДНК, змішану з буфером для нанесення проб так, щоб об'єм буферу становив 1/6 об'єму кінцевої суміші. Електрофорез проводять при напрузі 2-4 В/см^2 протягом 30-40 хв. Зони ДНК реєструють, освітлюючи гель ультрафіолетовими променями. Одержану електрофореграму фотографують. Як ДНК стандарт у всіх випадках використовували ДНК-маркер фірми “Fermentas” SM 0311.

2.4. Виділення плазмідної ДНК з клітин *E. coli* [Маниатис, 1984]

Реактиви: Розчин I: 50 мМ глюкоза, 25 мМ Tris-HCl (pH 8.0), 10 мМ ЕДТА (pH8.0). Розчин II: 0,2 М NaOH, 1% SDS, 10мМ Tris-HCl (pH8.0), 1мМ ЕДТА (pH8.0). 5М Калій ацетат, 3М Натрій ацетат, 7,5М Амоній ацетат, фенол (pH 8.0), ізопропанол, 96% спирт, 70% спирт.

Бактерійні трансформанти нарощують в 100 мл селективного середовища протягом ночі. Біомасу осаджують центрифугуванням при 4000 об/хв. протягом 15 хв. Клітини промивають розчином I без лізоциму і центрифугують при 4000 об/хв. 12 хв. Супернатант зливають, а осад ресуспендують та додають 4 мл розчину II, перемішують, щоб суспензія стала в'язкою і витримують 5 хв при 0^{o}C. Потім додають 3 мл 5М ацетату калію, перемішують і залишають на холоді. Через 15 хв суміш центрифугують при 9000 об/хв. 15 хв, супернатант переносять в чисту пробірку і додають 1/10 об'єму ацетату натрію та 0,6 об'єму ізопропанолу. ДНК осаджують центрифугуванням при 9000 об/хв 15 хв. Осад розчиняють в 300 мкл ТЕ-буферу. Потім додають 2 об'єми ацетату амонію і інкубують 15 хв при кімнатній температурі. Центрифугують при 5000 об/хв 15 хв, до супернатанту додають 1/10 об'єму ацетату натрію та 0,6 об'єму ізопропанолу та інкубують при кімнатній температурі 10 хв. Після центрифугування при 12000 об/хв 10 хв, супернатант зливають, а осад підсушують і розчиняють в 200 мкл ТЕ-буферу. Для остаточної депротеїнізації до розчину додають 200 мкл фенолу, насиченого буфером, центрифугують при 12000 об/хв і відбирають верхню (водну) фазу. Додають 1/10 об'єму ацетату натрію, 2 об'єми етанолу. Потім центрифугують 10 хв при 12000 об/хв. Осад (плазмідна ДНК) промивають 70% етанолом, підсушують і розчиняють в стерильному ТЕ-буфері.

2.5. Лігування фрагментів ДНК

Готували 10 мкл суміші фрагменту і розщепленого вектора (400-800 нг) у бідистильованій воді; реакційна суміш містила рівну чи вищу (до 3 раз) концентрацію фрагменту по відношенню до концентрації вектора.Додавали наступні компоненти до суміші:

10× буфер для лігування — 0,5 мкл,Т4 ДНК лігаза — 2-4 одиниці, бідистильована H_2O — до 5 мкл, інкубували суміш при 16°С протягом 1 год, інактивували лігазу протягом 15 хв.

2.6. Електротрансформація клітин *E. coli*

Свіжу колонію бактерійних клітин інокулюють в 2 мл рідкого середовища LB та вирощують в умовах аерації при 37°С протягом ночі. 1 мл „нічної" культури переносять в 100 мл рідкого середовища LB та підрощують до OD_{600} = 0,5 – 1,0 (кювета 1 см), що відповідає 10^{10} кл/мл. Клітини осаджують 15 хв при 4 000 об/хв, 4°С і промивають в 400 мл стерильної холодної бідистильованої води. Клітини ресуспендують в 200 – 300 мкл холодного стерильного 10 % гліцерину і переносять в стерильні епендорфи по 40 мкл для довготривалого зберігання при – 70°С.

До 40 мкл суспензії клітин додають 1-4 нг плазмідної ДНК (зразок) і вносять суміш на дно охолодженої 2-мм кювети; здійснюють електротрансформацію (12,25 кВ/см, 50 мкФ, 129 Ом) тривалістю 5-6 мс. До кожного зразка додають по 1 мл рідкого середовища LB, трансформовані клітини інкубують протягом 50 хв при 37^0С. Отриману суспензію висівають на чашки з селективним середовищем та інкубують від 12 до 16 годин при 37°С.

2.7. Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР)

Для забезпечення протікання паралельних реакцій готували реакційну суміш, у склад якої входили вода, буфер, динуклеотидтрифосфати (дНТФ), праймери і полімераза, в одному епендорфі, а потім розділяли на кілька окремих проб. Після розділення додавали розчини $MgCl_2$ і ДНК.

Склад реакційної суміші:

реагент	кінцева концентрація
стерильна деіонізована вода	-
10x PCR буфер	1x
2 мМ суміш дНТФ	0,2 мМ кожного

праймер 1	0,1-1 мкл
праймер 2	0,1-1 мкл
полімераза	1,25 u/ 50мкл
матриця ДНК	10 пг- 1 мкг

Якщо проводили ПЛР з дріжджових колоній, додавали в суміш 0,1% ДМСО, а як матрицю – невелику кількість клітин дріжджів з чашки Петрі стерильною паличкою.

Дані реакції проводилися на ампліфікаторі Gene Amp© PCR System 9700

2.8. Асамблея Гібсона (Gibson assembly) [Fitzpatrick , 2006]

Асамблея Гібсона – метод клонування фрагментів. Процес здійснення його відбував наступним чином 1). Підбір праймерів, для того, аби ампліфікувати певні фрагменти.2)ПЛР-ампліфікація потрібних фрагментів. 3) Лінеаризація фрагментів з використанням ендонуклеаз розщеплення. 4) визначення концентрації фрагментів, використовуючи електрофорез у агарозному гелі або нанодроп, чи інші методи. Змішування зразків ДНК у потрібній кількості до Gibson Assembly Master Mix. Інкубація при 50^0C упродовж двох годин.

Отриманою сумішшю трансформували компетентні клітини *E. coli*.

2.9. Електротрансформація *C. famata*

Трансформацію виконували згідно наступної методики.Клітини штаму дріжджів нарощували в пробірці з YPD через ніч.Здійснювали засів клітин в колби YPD і вирощували до OD_{540}=1.8-2. Клітини осаджували, та суспендували в залишку середовища і додавали 40 мл 50мМ КФ-буферу (pH 7.5) + 25мМ DTT. Інкубувати 15 хвилин, 30^0C. Осаджували центрифугуванням при 3000 об/хв, п’ять хвилин. Відмивали холодною водою 4 рази. Один раз – 1М розчином сахарози. Ресуспендовували та розаліквочували біомасу по 200 мкл. Додавали до клітин зразки ДНК. Трансформували клітини за умов: напруга – 2,3кВ; ємність – 50 мкФ; резистентність – 100 Ом. До зразка в кюветі негайно додавали 1 мл YPD + 1М сахароза, переносили в стерильну пробірку з 1 мл YP. Інкубували при 30^0C,

на шейкері, упродовж 2,5-3 год. Перед посівом на чашки, у випадку мінімального середовища, промивавали у воді двічі. Засівали на чашки та інкубували упродовж 2-4 діб .

2.10. Довготривале зберігання бактерійних та дріжджових трансформантів

Для довготривалого зберігання бактерійні трансформанти вирощують в пробірках (3 мл) селективного середовища при 37°С протягом ночі. Клітини осаджують центрифугуванням при 3000 об/хв протягом 10-15 хв. 0,35 мл клітин вносять у мікропробірку з 0,1 мл 70 % стерильного холодного гліцерину, заморожують та зберігають при -70°С.

Дріжджові трансформанти вирощують в пробірках (3 мл) YPD середовища при 30°С протягом ночі. Клітини осаджують центрифугуванням при 3000 об/хв протягом 10-15 хв. 0,25 мл клітин вносять у мікропробірку з 0,25 мл 70 % стерильного холодного гліцерину, заморожують та зберігають при -70°С.

2.11. Програмне забезпечення для пошуку та аналізу нуклеотидних та амінокислотних послідовностей

У роботі використовувалися бази даних *Debaryomyces hansenii* http://www.broadinstitute.org/ annotation/genome/candida_group/MultiHome.html та ДНК проводили за допомогою програм: NEBcutter V2.0

H
Y
P
E
R
L
I
N
K

2.12. Аналіз флавінів

"
h

Флавіни з культурального середовища були розділені паперовою хроматографією в 5% Na_2HPO_4 (pH 8,0) та аналізовані відповідно до коефіцієнту затримки (Rf: ФМН– 0,50; РФ – 0,37; РоФ – 0,22; АФ – 0,10) [Juri et al., 1987; György et al., 1967]. Фракції флавінів елюювали киплячою водою та кількісно оцінили спектрометричним аналізом на відповідні довжини хвиль, використовуючи молекулярні коефіцієнти екстинкції [Chapman and Reid, 1999; Tyagi et al., 2009].

2.13. Мас-спектрометрія (МС)

Очищений 8-амінорибофлавін, синтезований *Candida famata*, було ідентифіковано методом хроматографії та виміряно шляхом прямого введення в пристрій іонізації. Визначення зразків проводили на приладі amaZon ETD Ion Trap Mass Spectrometer (Bruker, Billerica, MA, USA) після їх прямого введення в мас-спектрометр методом позитивного та негативного електророзпилюввання. Азот використовувався і як газ осушувача, і як газ розпилення. Температура газу осушувача в джерелі іонізації становила 220°C. Потік газу становив 5 $л \cdot хв^{-1}$, тиск газу розпилення становив 10 psi, напруга в капілярі 4500 V. Після МС експерименту, було проведено МС-МС аналіз (тандемна мас-спектрометрія) цільових іонів. Більше того, було проведено фрагментаційний аналіз МС (3) цільових іонів, отриманих після МС(2). Дані було оброблено за допомогою програмного забезпечення Data Analysis 4.2 software (Bruker Daltonics).

2.14. ВЕРХ (HPLC) та РХ-МС (LC-MS) аналізи

Хроматографічне розділення було проведене за допомогою градієнтної системи високоефективної рідинної хроматографії Dionex, обладнаної четвертинним насосом, матричним діодним детектором, автосамплером та дегазатором (Dionex UltiMate 3000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Колонка ACE C18 (4.6 × 250 мм, розмір частинки 5 мкм) використовувалась при 40°C. Рухома фаза складалась із розчинника А (10 мМ амоній форміат та 0,1% розчин мурашиної кислоти в воді) і розчинника Б (10 мМ амоній форміат та 0,1%

розчин мурашиної кислоти в метанолі) зі швидкістю потоку 1 мл·хв$^{-1}$. Лінійне градієнтне елюювання проходило наступним чином: 0 хв, 5 % Б; 5 хв, 90 % Б; 6 хв, 90 % Б; і назад до 5 % через 0,2 хв. Час врівноваження системи між введенням зразків становив 3,8 хв. Об'єм ін'єкції становив 20 мкл. Для збору та аналізу даних використовували програмне забезпечення Dionex (Chromeleon ver. 7.8). Ультрафіолетові та видимі спектри випромінювання було проаналізовано в області 210 – 600 нм.

Ультра високоефективну рідинну хроматографію в поєднанні з мас-спектрометрією (УВЕРХ-МС-МС) було проведено з використанням Dionex UltiMate 3000 RS series (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) та amaZon ETD Ion Trap Mass Spectrometer (Bruker, Billerica, MA, USA).

Відокремлення амінорибофлавіну від інших сполук проводили на колонці Luna C18 (4.6 × 150 мм, розмір частинки 3 мкм) (Phenomenex, Torrance, CA, USA). Температура колонки підтримувалась при 40°C, об'єм ін'єкції становив 5 мкл. Рухомими фазами УВЕРХ-МС-МС були ті самі розчини, що й при ВЕРХ аналізі. Лінійне градієнтне елюювання проходило наступним чином: 0 хв, 5 % Б; 10 хв, 90 % Б; 12 хв, 90 % Б; назад до 5 % через 0,5 хв. Час врівноваження системи між введенням зразків становив 4,5 хв. Швидкість потоку становила 0,5 мл·хв$^{-1}$. Аналіз проводили за допомогою іонізації з електророзпиленням (ESI), спектри визначали в режимі позитивних іонів. Збір даних здійснювався в режимі моніторингу множинних реакцій (MRM), використовуючи 378 (m/z) для іона-попередника, в той час як два дочірніх іони 244 (основний) та 361 (m/z) були обрані для якісного аналізу. Для збору та аналізу даних використовували програмні забезпечення HyStar ver. 3.2 та Data Analysis 4.2 software (Bruker Daltonics).

3. РЕЗУЛЬТАТИ

3.1. Розробка системи мультикопійної інтеграції для *Candida famata*

Для розробки системи мультикопійної інтеграції для дріжджів *C. famata* було використано селективний маркер, ген *SAT1*, що забезпечує резистентність до антибіотика норзеотрицину. Ген *SAT1 Streptomyces noursei* кодує стрептотрицин ацетилтрансферазу. Послідовність нуклеотидів цього гена було адаптовано для експресії у дріжджів, що належать до так званого CTG-клайду. У таких організмів кодон CTG кодує серин, тоді як у більшості організмів, цей кодон кодує лейцин. Об'єкт наших досліджень, дріжджі *C. famata* належать до CTG-клайду. Послідовність адаптованого гена *SAT1* під контролем сильного конститутивного промотора гена *TEF1* дріжджів *Debaryomyces hansenii* було отримано у складі плазміди pDhSAT1-ACT1p-YFP [Millerioux et al., 2011], що була нам люб'язно надана проф. Ніколасом Папоном з університету м. Турс (Франція). Касету експресії гена *SAT1* було ампліфіковано за допомогою ПЛР з використанням пари праймерів OL86 (AAA GCG GCC GCA TAT GAG TCT TAT ATA TAT C) та OL87 (AAG CGG CCG CAT ATG TCA CAT AAC CAC AAG) та плазміди pDhSAT1-ACT1p-YFP як матриці. Отриманий ПЛР-фрагмент, величиною 1724 п.н. було очищено шляхом елюції з агарозного гелю, оброблено ендонуклеазою рестрикції NdeI та ліговано з NdeI-лінеаризованим та дефосфорильованим вектором pUC57. Сконструйована плазміда має величину 4440 п.н. та отримала назву pNTC (Рис. 3.1). Коректність сконструйованої плазміди було підтверджено за допомогою рестрикційного аналізу та секвенування.

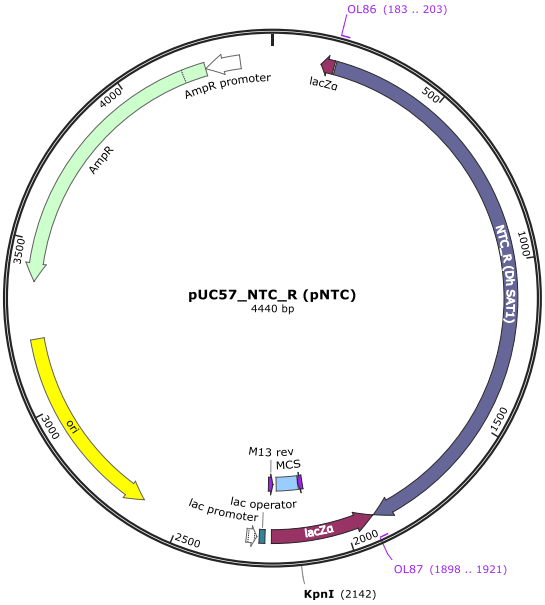


Рис. 3.1. Кільцева схема плазміди pNTC (4440 п.н.), що містить ген *SAT1 S. noursei* адаптований до експресії в *C. famata*, позначено синьою стрілкою

Вектор pNTC було лінеаризовано рестриктазою AatII та використано для електротрансформації штаму L20105 дріжджів *C. famata*. Особливість цієї серії експериментів полягала у довготривалому відживленні трансформованих клітин після електропорації. Зразки клітин у багатому середовищі YP р з додаванням 0,5 М сахарози інкубували на орбітальному шейкері (220 об/хв) при 30ºС упродовж 3, 5, 7 та 24 годин. Клітини висівали на середовище YPD, що містить норзеотрицин у концентраціях 40, 75, 100, 150 мг/л. Колонії аналізували на 3-доби культивування. Встановлено найвищу частоту трансформації після відживлення трансформантів упродовж 24 годин на середовищі з додаванням 40 мг/л норзеотрицину, яка становила 10^4 трансформантів/мкг ДНК. Частота трансформації знижувалась пропорційно до зростання концентрації антибіотика в середовищі. Частоти трансформації на середовищі з додаванням 75, 100 та 150 мг/л норзеотрицину становили 10^2, 50 та 8-10 трансформантів/мкг ДНК. Для селекції трансформантів з однією копією цільової плазміди було використано норзеотрицин в концентрації 10 мг/л. Отже, кількість копій інтегрованих плазмід становить 15.

3.2. Оптимізація CRISPR-Cas9 системи для *C. famata*

Нами використано підхід біло/червоної селекції для фенотипової ідентифікації *ade2*-мутантів *C. famata* L20105, отриманих за допомогою CRISPR-Cas9-опосередкованого введення мутацій у відповідний ген. Для оцінки ефективності CRISPR-Cas9 у клітинах *C. famata* L20105 було сконструйовано відповідні вектори, які забезпечували експресію ендонуклеази Cas9 і gРНК, яка містила 38-58 п. н. послідовність гена *ADE2* (кодує фосфорибозиламіноімідазол карбоксилазу) [Lyzak, et al., 2016].

Вже реалізовані нами зміни у конструкції для адаптації CRISPR-Cas9 системи для дріжджів *C. famata* допомогли досягти високої частоти електротрансформації [Lyzak, et al., 2016]. Проте низька частота появи колоній червоного кольору свідчить про недостатню ефективність роботи CRISPR-Cas9 системи і вона потребує подальшої адаптації. CRISPR-Cas9 систему було додатково модифіковано шляхом експресії CAS9 під контролем промотора гена *CfMAL2*, що активується мальтозою. Плазміду pcrADE / LEU2 / ARS використано як вихідну. Вона слугувала матрицею для ампліфікації вектора, що не містить промотора гена *ENO1* за допомогою пари праймерів Ко845 (TAT ATT ATA GAC GTC ATG GAT AAA AAG TAT AGT ATT GGT TTA G)/Ко846 (CGA CGT CGT ACC CAA TTC GCC CTA TAG T).

Регульований мальтозою промотор гена *CfMAL2* було ампліфіковано за допомогою ПЛР із геномної ДНК *C. famata* L20105 з використанням пари праймерів Ко843 (ATT GGG TAC GAC GTC GAT AGC CTG ACC CTG TAG AG)/Ко844 (TCC ATG ACG TCT ATA ATA TAC GAG TTT CTA TTA ATT TAT ATG).

Промотор *CfMAL2* та цільовий вектор об’єднували методом Gibson assembly. Отриману плазміду (pYA_MAL2p) (Рис. 3.3) перевірено у три етапи: рестрикційним аналізом за допомогою ендонуклеаз рестрикції AatII та XbaI, шляхом ПЛР з використанням праймерів Ко847 (CCG ACT AGC GAA TAA CTA G)/Ко848 (TCT TCT TGC TGT TCT TTT TAA AC) та секвенуванням промоторної ділянки.

Рис. 3.3. Схема плазміди pYA_MAL2p.

Ефективність модифікованої системи було перевірено, шляхом електротрансформації дріжджів *C. famata* L20105 плазмідою pYA_MAL2p. Використання плазміди pYA_MAL2p не підвищувало частоту появи червоних колоній. Низька ефективність CRISPR-Cas9 системи найвірогідніше обумовлена неефективним процесом дозрівання gРНК.

Оптимізацію системи було розпочато з модифікації касети, що містить gРНК. Для цього касету для експресії gРНК було поміщено під контроль сильного конститутивного промотора *TEF1*. Послідовність gРНК було фланковано тРНК^{Ala} з 5’-кінця та рибозимом вірусу гепатиту дельта (HDV) з 3’-кінця (Рис. 3.4).

Розщеплення тРНК на 5’-кінці за допомогою ендогенної РНКази Z сприяє процесингу gРНК без зайвих нуклеотидів. У свою чергу, рибозими як елементи РНК, що здатні до самосплайсингу, можуть використовуватися для видалення неспецифічних нуклеотидів на 5’- і 3’-кінцях, що утворюються внаслідок транскрипції gРНК. Таким чином, фланкування за допомогою рибозиму дельта вірусу гепатиту (HDV) допоможе отримати чітко визначену послідовність на 3’-кінці [Ng et al. 2017; Weninger , 2016].

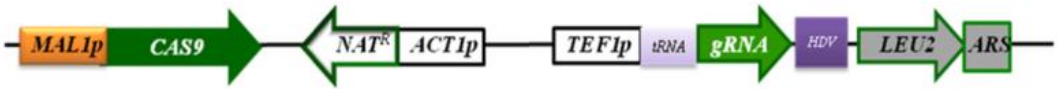


Рис. 3.4. Схема плазміди pYA_MAL2p_TEF1p_tRNA^{Ala}+gADE+HDV

За основу для подальших конструювань використовувалась плазміда pYA_MAL2p, що містить ген *CAS9* під контролем промотора гена альфа глюкозидази – *MAL2p*. Як матрицю для ампліфікації gРНК було використано

плазміду pcrADE/LEU2/ARS. Було використано праймери Ко893 (CGG GGT ACC GGG CGT GTG GCG TAG TTG GTA GCG CGT CTG CCT TGC AAG CAG AAG GTC ACT GGT TCG ATT CCT GTC TCG TCC ACA ACA ATC ATA CGA CCT AAT) та Ко894 (GGA TCC GTC CCA TTC GCC ATG CCG AAG CAT GTT GCC CAG CCG GCG CCA GCG AGG AGG CTG GGA CCA TGC CGG CCA AAA AGC ACC GAC TCG GTG C), що містять послідовності тРНК^{Ala} та рибозиму дельта вірусу гепатиту (HDV), відповідно. Отже, ампліфікований фрагмент містить gРНК до ділянки гена *ADE2 C. famata* L20105 фланковану тРНК^{Ala} на 5'-кінці та рибозимом HDV на 3'-кінці. Промотор *TEF1* ампліфіковано з геномної ДНК *C. famata* L20105 за допомогою праймерів Ко895 (CCG GAA TTC AAC ATA GAT ACA CAT ACA TAG TGC) та Ко896 (CGG GGT ACC TTT GCT TAA TGT ATA ATA ATA GTA TAC).

Для клонування отриманих фрагментів використовували плазміду pUC57. Отже, плазміду pUC57 обробляли ендонуклеазами рестрикції EcoRI/BamHI; промотор *TEF1* – EcoRI/KpnI; а gРНК, фланковану тРНК^{Ala} та рибозимом HDV – KpnI/BamHI та лігували. Лігаційною сумішшю трансформували бактерії *E. coli* DH5α. Проводили так звану «blue-white»-селекцію трансформатів (від англ. blue – синій та white – білий), що ґрунтується на порушенні явища α-комплементації. Виділена із білих колоній плазмідна ДНК слугувала матрицею для зчитування вставки для майбутнього конструкту системи CRISPR-Cas9 з використанням праймерів Ко903 (CTT TAA TTT GAG ATC TAA CAT AGA TAC ACA TAC ATA GTG C) та Ко904 (CCT CGA AGA TCT GTC CCA TTC GCC ATG CCG AA). Ампліфіацію вектора pYA_MAL2p, що не містить фрагмента gРНК здійснювали за допомогою пари праймерів Ко905 (GGA CAG ATC TTC GAG GAG AAC TTC TAG TAT ATC)/ Ко906 (ATG TTA GAT CTC AAA TTA AAG CCT TCG AGC GTC). Вектор та вставку об'єднували за допомогою Gibson assembly. Колонії *E. coli* DH5α, отримані у результаті електрорансформації перевіряли методом ПЛР із використанням пари праймерів Ко897 (GAC TAG CCT TAT TTT AAC TTG C)/ Ко907 (GTG GAT CCT AAG AAA AAG AGA AAG GTT). Сконструйовану плазміду pYA_MAL2p_TEF1p_tRNA^{Ala}+gADE+HDV (Рис. 3.4), перевірено за

допомогою рестрикційного аналізу та секвенування. Наступним етапом була заміна промотора гена *CAS9* для більш ефективної експресії. Ген *CAS9* поміщено під контроль промотора *ENO1*, а gRNA – залишається під контролем промотора гена *TEF1*, gRNA фланковано tRNA аланіну та рибозимом HDV (Рис. 3.5). Після трансформації дріжджів *C. famata* плазмідою pYA_ENO1p _TEF1p_ $tRNA^{Ala}$+gADE+HDV отримано колекцію трансформантів червоного кольору, що свідчить про ефективне функціонування CRISPR-Cas9 системи.

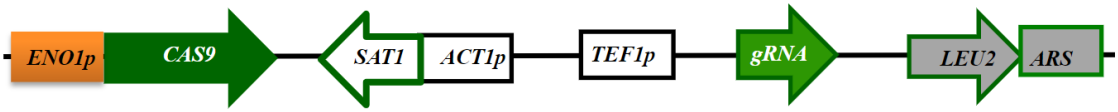


Рис. 3.5. Схема плазміди pYA_ENO1p _TEF1p_ $tRNA^{Ala}$+gADE+HDV

Результати досліджень свідчать, що модифікації CRISPR-Cas9 системи для функціонування у клітинах дріжджів *C. famata* виявились результативними та значно підвищили ефективність системи. Модифікації CRISPR-Cas9 системи полягали у експресії gРНК під контролем сильного конститутивного промотора *TEF1*, послідовність gРНК – фланкована $тРНК^{Ala}$ на 5'-кінці та рибозимом дельта вірусу гепатиту (HDV) на 3'-кінці, ген *CAS9* поміщено під контроль промотора гена *ENO1*, наявність ARS-елемента.

3.3. Адаптація послідовностей генів генів *rosB* та *rosA S. davaonensis* для експресії в геномі дріжджів *C. famata*

Особливістю геному *S. davaonensis* полягає у високому вмісту GC-пар, що сягає 70,6% [Jankowitsch et al., 2012]. Геном дріжджів *C. famata* містить близько 36%. Отже, для ефективної експресії генів *rosB* та *rosA S. davaonensis* в системі *C. famata* необхідна адаптація їх послідовності. Адаптація генів проводилась за допомогою ресурсу http://atgme.org/ Для подальшого конструювання цільових касет експресії з послідовностей генів було виключено послідовності, що впізнаються рестриктазами EcoRI (GAATTC) EcoRV (GATATC) NcoI (CCATGG) PstI (CTGCAG) (Рис. 3.6).

>rosB_Sd_adapt_CTG
ATGGCCTTAAAGGCTCTTATATTGAACACAACCTTGCGTCGAAGTCCTTCTCGTTCACAGACACA
GGGGTTAATTGACAAGGCCGTACCATTATATGAGAAGGAAGGGATTGAAACTGAAGTTGTCAGAG
TGATCGACCATGACATAGAGCAAGAATATTGGGATGACTATGATGATTGGAACGCCGGAGAAAAA
GCCCGAAGAGAAGACGAATGGCCATGGCTTTTAGAGAAAATACGAGAAGCTGATATTTTAGTGAT
AGCTACTCCAATCACTCTTAATATGTGTACCTCCGCTGCCCACGTTATACTTGAAAAATTGAACC
TTATGGATGAGCTTAACGGTGACACAAAGCAATTCCCACTTTACAATAAAGTGGCTGGGTTGCTT
ATGTGCGGTAATGAAGATGGGGCACACCACGTCGCTGGTACCGTTCTTAACAATTTAGGGCGTTT
AGGGTATTCCGTCCCACCAAACGCCGCCGCATATTGGTTAGGACCTGCTGGAACCGGGCCAGGAT
ATATTGAGGGAAAAGGGGATCGACACTTCCACACTAACAAATTGATACGTTTTATGGTCGCCAAT
ACTTCACATTTGGCCAGAATGCTTCAAGAGACACCTTACACAACCGATTTAGAAGCATGTGCTCA
GGCTGCCAGAGAAGAAAGTGACGACGTGTTTGCCATTCGAGTAAATGTCAATACCCCTGCCATTC
GATACAAACGTTTTCAGAAGTTAGGTGAAGTAAAGGTTGAGGAATCTCAGTTAGGATGA

>RosA_Sd_adapt_CTG
ATGCGTCCTGAGCCAACAGAGCATCCTGAAAGAACTGCCGCTCAAAGATTGTACCAGTACAACGT
GGATTTGAAGGTCGCCTTCGTGTTATATGCTGTTGCTAAGTTGCACTTACCAGATTTGTTAGCTG
ACGGGCCTAGAACTACAGCAGACTTGGCTGC**C**GCCACAGGTAGTGATCCTAGTAGACTTAGAAGA
CTTTTACGAGCAGCCGCAGGTGCCGATGCTTTGAGAGAGGTCCCAGAAGACTCTTTCGAACTTGC
TCCAATGGGTGATTTATTACGTTCTGGTCACCCACGTAGTATGCGTGGAATGACCACCTTCTTCG
CAGAGCCTGACGTATTAGCAGCTTACGGGGACTTGGTAGAGAGTGTGCGTACTGGGGTTCCTGCT
TTCCAATTACGACACCGAGAACCTTTATACGATTTTTTAGCACGTCCTCAACATAAAGAAGTGCG
AGATGAATT**T**GACGCCGCTATGGTCGAGTTTGGGCAATACTTTGCAGACGATTTCTTAACTTCCT
TTGATTTCGGACGATTCACCAGATTCGCTGACATCGGTGGGGGTAGAGGTCAGTTCTTGGCAGGG
GTCTTGACCGCCGTTCCATCATCCACAGGTGTTCTTGTTGACGGTCCAGCCGTTGCTGCATCCGC
ACATAAGTTCCTTGCTTCCCAAAACTTAACCGAAAGAGTAGAAGTCCGAATCGGGGATTTTTTCG
ATGTGTTACCTACAGGTTGCGACGCCTATGTACTTAGAGGGGTGTTGGAAGATTGGGCAGACGCT
GATGCAGTACGACTTTTGGTTAGAATACGTCAGGC**T**ATGGGTGATGCTCCTGAGGCACGATTGTT
GATATTAGACTCAGTGATAGGAGAGACCGGAGAATTAGGTAAGGTCCTTGATTTAGACATGTTGG
TCTTAGTGGAGGGTGAACATCGTACAAGAGCACAGTGGGACGACCTTCTTGCTCGTGCCGGGTTC
GATAT**T**GTAGGGATTCACCCTGCCGGAGATGTTTGGGCCGTTATAGAATGTAGAGGAACTGCTGG
TTGA

Рис. 3.6. Послідовності генів *rosB* та *rosA S. davaonensis* із модифікованими CTG-кодонами в системі *C. famata* та з вилученням послідовностей, що впізнаються рестриктазами EcoRI (GAATTC) EcoRV (GATATC) NcoI (CCATGG) PstI (CTGCAG)

3.4. Конструювання плазмід для посилення експресії генів *FMN1, rosB* та *rosA*

Послідовності генів *rosB* та *rosA S. davaonensis* із модифікованими CTG-кодонами (Рис. 3.6) було синтезовано на фірмі BioCat GmbH (Heidelberg, Germany). Для експресії цільових генів було сконструйовано проміжну плазміду,

що містить промотор та термінатор гена *TEF1 D. hansenii*. Промотор та термінатор гена *TEF1 D. hansenii* було ампліфіковано з геномної ДНК *D. hansenii* CBS767 з використанням відповідних пар праймерів: Ko427 (AAA AAG CTT GCT CCC CCC TAC CAA GCC TAC) / Ko428 (GAC TTT CCC AAA TAC GTT TAA GGA GCC TGC AGG TCG ACG CGG CCG CGG ATC CTT TGA TTA ATT AAT ATA TAA AAT ATA TGT TTG TGG) та Ko429 (CCA CAA ACA TAT ATT TTA TAT ATT AAT TAA TCA AAG GAT CCG CGG CCG CGT CGA CCT GCA GGC TCC TTA AAC GTA TTT GGG AAA GTC) / Ko430 (AAA TCT AGA GAT TAT TGA CTC GAG ATG TTG CGC CG). Два ампліфікованих фрагменти було поєднано да допомогою ПЛР з використанням праймерів Ko427 та Ko430. Ампліфікований фрагмент, що місить промотор та термінатор гена *TEF1 D. hansenii* було елюйовано з агарозного гелю, оброблено рестриктазами HindIII та XbaI, та клоновано у плазміду pTb [Dmytruk et al. 2006] яка була оброблена тими самими рестриктазами HindIII/XbaI. Синтетичний ген *rosB S. davaonensis* який був фланкований сайтами для рестриктаз BamHI та PstI було клоновано до складу попередньо сконструйованої плазміди використовуючи ці рестриктази між промотором та термінатором гена *TEF1 D. hansenii.* Аналогічний підхід було використано для клонування синтетичного гена *rosA S. davaonensis*, використовуючи рестриктази BamHI та PstI. Сконструйова плазміда отримала назву pT_rosA (Рис. 3.7). На наступному етапі ген *IMH3 D. hansenii*, що кодує інозинмонофосфат дегідрогеназу та забезпечує резистентність до мікофенольної кислоти [Dmytruk et al. 2011] було ампліфіковано з геномної ДНК *D. hansenii* CBS767 з використанням праймерів IMH3-fr (AAT TCT CGA GGT CGA TGG TCT TGA TCA TTC) та IMH3-rev (TAA TCT CGA GGC ATT CTG TTC CAG TTT CTG) та клоновано у сайт XhoI плазміди pT_rosB. В результаті, сконструйовано плазміда отримала назву pT_rosB_IMH3 (Рис. 3.7).

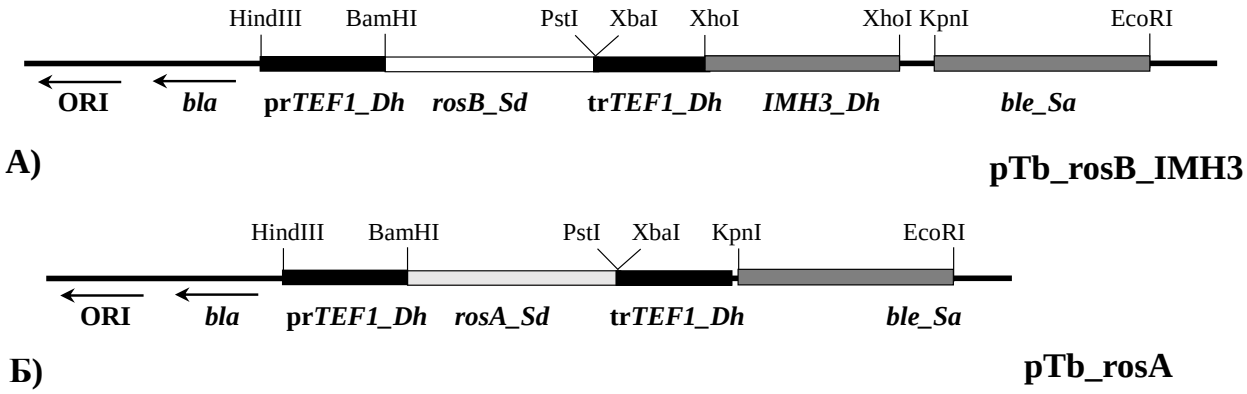
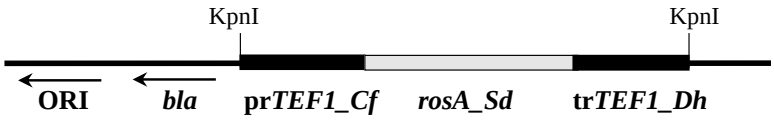


Рис. 3.7. Лінійні схема плазмід pT_rosB_IMH3 (A) pT_rosA (B). Чорними відрізками позначено промотор та термінатор гена *TEF1 C. famata* та *D. hansenii*, білим відрізком позначено адаптований ген rosB *S. davaonensis,* світло сірим відрізком позначено адаптований ген rosA *S. davaonensis*, темно сірими відрізками позначено гени *IMH3 D. hansenii* та *ble S. aureus*

Конструювання плазміди для одночасного посилення експресії генів *FMN1, rosB* та *rosA* було проведено у декілька етапів. На першому етапі за допомогою ПЛР було ампліфіковано промотор гена *TEF1 C. famata* та ген *rosA* разом з термінатором гена *TEF1 D. hansenii* з використанням пар праймерів Ko833 GGT ACC GGA TCC TAA CGA ACA GCT CAT CAG ATT TAC / Ko834 GCA TGG ATC CTT TGC TTA ATG TAT AAT AAT AGT ATA CTG та Ko835 AAG CAA AGG ATC CAT GCG TCC TGA GCC AAC AG / Ko836 GCT CGG TAC CAT GTT GCG CCG AAC AAT CAC AT, відповідно. Як матриці для ПЛР було використано хромосомну ДНК штаму VKMY-9 *C. famata* та плазміду pT_rosA. Ампліфіковані ПЛР фрагменти містять промотор *TEF1 C. famata* та ген *rosA* з термінатором гена *TEF1 D. hansenii* та мають величини 680 п.н. та 1345 п.н. Обидва фрагменти було поєднано за допомогою ПЛР, що перекривається (overleap PCR) з використанням пари праймерів Ko833/ Ko836 та відповідних фрагментів. Ампліфікований об’єднаний фрагмент величиною 2018 п.н. було елюйовано з агарозного гелю, оброблено рестриктазою KpnI та ліговано з базовим вектором pUC57, який попередньо було лінеаризовано KpnI та дефосфорильовано. Сконструйована проміжна плазміда отримала назву pUC57_pTEF1Cf_RosA_tTEF1Dh (Рис.

3.8.А). Коректність конструкту було підтверджено за допомогою рестрикційного аналізу з використанням ендонуклеаз рестрикції KpnI (очікувані фрагменти 2710, 1998 п.н.), BamHI (4011, 664, 33 п.н.), XbaI (4376, 322 п.н.), PstI (2943, 1765 п.н.). Отримані фрагменти відповідали очікуваним фрагментам (Рис. 3.8.Б).



А) pUC57_pTEF1Cf_RosA_tTEF1Dh

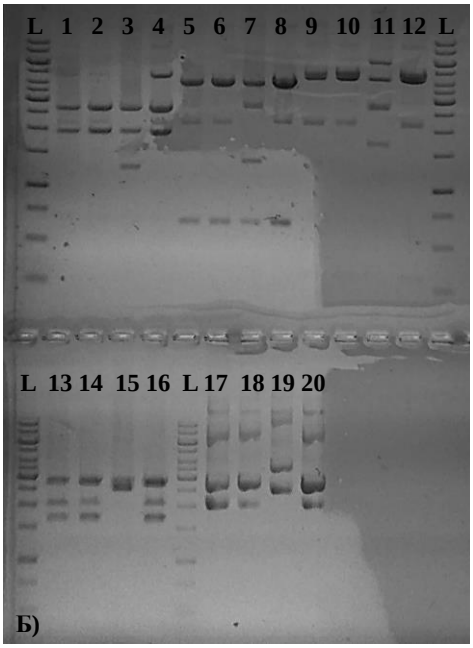


Рис. 3.8. А) Лінійна схема плазміди pUC57_pTEF1Cf_RosA _tTEF1Dh (4708 п.н.). Чорними відрізками позначено промотор та термінатор гена *TEF1 C. famata* та *D. hansenii*, сірим відрізком позначено адаптований ген rosA *S. davaonensis*. **Б)** Електрофореграма рестрикційного аналізу плазміди pUC57_pTEF1Cf_ RosA_tTEF1Dh. Лінії 1-4, плазміди 1,2,3,4 оброблені рестриктазою KpnI; лінії 5-8 – BamHI; лінії 9-12 – XbaI; лінії 13-16 – PstI; лінії 17-20 – нативні форми плазмід; L – маркер молекулярної ваги

На наступному етапі за допомогою ПЛР було ампліфіковано промотор гена *TEF1 C. famata* та ген *rosB* разом з термінатором гена *TEF1 D. hansenii* з використанням пар праймерів Ko827 gta tAA GCT TGT CGA CTA ACG AAC AGC TCA TCA GAT TTA C / Ko828 CCA TGG ATC CTT TGC TTA ATG TAT AAT AAT AGT ATA CTG та Ko835 Ko829 AAG CAA AGG ATC CAT GGC CTT AAA GGC TCT TAT ATT G / Ko830 GGC CCG TCG ACA TGT TGC GCC GAA CAA TCA CAT,

відповідно. Як матриці для ПЛР було використано хромосомну ДНК штаму VKMY-9 *C. famata* та плазміду pT_rosB_IMH3. ПЛР фрагменти, що містять промотор *TEF1 C. famata* та ген *rosB* з термінатором гена *TEF1 D. hansenii* та мають величини 684 п.н. та 1076 п.н. Обидва фрагменти було поєднано за допомогою overleap PCR з використанням пари праймерів Ko827/Ko830 та відповідних фрагментів. Ампліфікований об'єднаний фрагмент pTEF1_rosB величиною 1743 п.н. було елюйовано з агарозного гелю. Фрагмент pUC57_pTEF1_RosA, що містить pUC57 та ген *rosA* під контролем промотора *TEF1Cf* та термінатора *TEF1Dh* було ампліфіковано з вектора pUC57_pTEF1Cf_RosA_tTEF1Dh за допомогою пари праймерів Ko833 GGT ACC GGA TCC TAA CGA ACA GCT CAT CAG ATT TAC / Ko838 GTT AAA GCT TGG CGT AAT CAT GGT C. Фрагмент pTEF1_FMN1 величиною 1525 п.н., що містить ген *FMN1 D. hansenii* під контролем промотора *TEF1Cf* та власного термінатора було ампліфіковано з вектора p19L2_ble_RIB1Cf_prTEF1_FMN1Dh [Yatsyshyn et al. 2009] за допомогою пари праймерів Ko825 GAT TAC GCC AAG CTT TAA CGA ACA GCT CAT CAG ATT TAC / Ko826 TTA GTC GAC AAG CTT ATA CAT AAT ACC TTA AGT AAA AGT ACC. Ген *IMH3 D. hansenii* величиною 2604 п.н., що планується використовувати як селективний маркер для селекції дріжджових трансформантів було ампліфіковано з хромосомної ДНК *D. hansenii* CBS767 за допомогою пари праймерів Ko831 CAT GTC GAC GGG CCC GTC GAT GGT CTT GAT CAT TCA TG / Ko832 GTT AGG ATC CGG TAC CGG GCC CGC ATT CTG TTC CAG TTT CTG TTC. Усі чотири фрагменти pTEF1_FMN1, pTEF1_rosB, IMH3 та pUC57_pTEF1_RosA було елюйовано з агарозного гелю та використано для поєднання в одну цільову плазміду за допомогою Асамблеї Гібсона. Коректність сконструйованої плазміди було підтверджено за допомогою рестрикційного аналізу з використанням рестриктаз AatII (10459 п.н.), BamHI (6146, 3649, 664 п.н.), HindIII (4747, 4211, 1501 п.н.), EcoRI (6369, 2294, 1367, 429 п.н.), BglII (4639, 2101, 1587, 1507, 625 п.н.), XbaI (4639, 1715, 1595, 1507, 1003 п.н.), KpnI (3566, 2195, 1998, 1684, 675, 341 п.н.) (Рис. 3.14 Б).

Сконструйована цільова плазміда отримала назву pFMN1/rosB/rosA/IMH3 (Рис. 3.9. А).

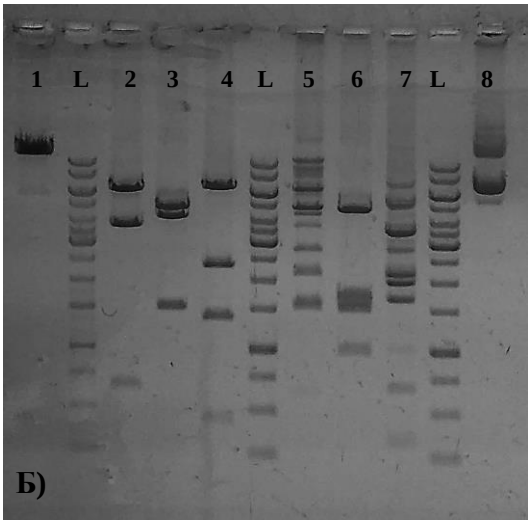


Рис. 3.9. А) Кільцева схема плазміди pFMN1/rosB/rosA/IMH3 (10459 п.н.). Сірими відрізками позначено промотор гена *TEF1 C. famata*, зеленим відрізком позначено термінатор гена *TEF1 D. hansenii*, помаранчевим, жовтим та червоним відрізками позначено гени *FMN1 D. hansenii,* адаптований гени *rosB* та *rosA S. davaonensis*, відповідно. **Б)** Електрофореграма рестрикційного аналізу плазміди pFMN1/rosB/rosA/IMH3. Лінія 1, плазміда оброблена рестриктазою AatII; лінія 2 – BamHI; лінія 3 – HindIII; лінія 4 – EcoRI; лінія 5 – BglII; лінія 6 – XbaI; лінія 7 – KpnI; лінія 8 – нативна форма плазміди; L – маркер молекулярної ваги

3.5. Конструювання продуцентів АФ на основі дріжджів *C. famata*

Для отримання продуцента амінорибофлавіну, у штам #13 *Candida famata* [Yatsyshyn et al, 2009] здатний до надсинтезу ФМН було введено вектор pT_rosB_IMH3 (Рис. 3.10.А), що містить касету експресії гена *rosB Streptomyces davaonensis* та селективний маркер, ген *IMH3*, що забезпечує резистентність до мікофенольної кислоти (МФК). Вектор pT_rosB_IMH3 було сконструйовано на попередньому етапі даного проєкту. Трансформанти відбирали на агаризованому середовищі YPD з додаванням зростаючих концентрацій МФК. Інтеграцію експресійної касети *rosB* в геном дріжджів було підтверджено за допомогою ПЛР з використанням пари праймерів специфічних до *rosB*: RBFa TAT TGA ACA CAA CCT TGC GTC G / RBRa ATC CTA ACT GAG ATT CCT CAA CC (Рис. 3.10.Б).

Трансформанти стабілізували шляхом культивування на неселективному поживному середовищі протягом 15-17 поколінь з подальшим їх перенесенням на селективне середовище з МФК. Наявність експресійної касети *rosB* у стабільних трансформантів було додатково підтверджено ПЛР-аналізом з використанням пари праймерів RBFa/RBRa та геномної ДНК стабілізованих трансформантів як матриці. Було отримано фрагменти очікуваної феличини (~0,75 т.п.н.). Пригнічувального ефекту накопичення АФ на ріст ізольованих штамів не спостерігали (Табл. 3.1).

Для оцінки продукції флавінів, стабільні трансформанти культивували упродовж 44 год в модифікованому середовищі Беркгольдера та при 30°С. Вихідна біомаса становила 0,15 г/л. Батьківський штам #13 та його похідний, що містить плазміду без експресійної касети *rosB S. davawensis* були використані як негативні контролі. Загальну продукцію флавінів в середовищі було визначено за допомогою спектрофотометричного аналізу. Додатково, вміст флавінів у культуральному середовищі аналізували за допомогою висхідної хроматографії. Зразки об’ємом 150 мкл були нанесені на хроматографічний папір та розділені в

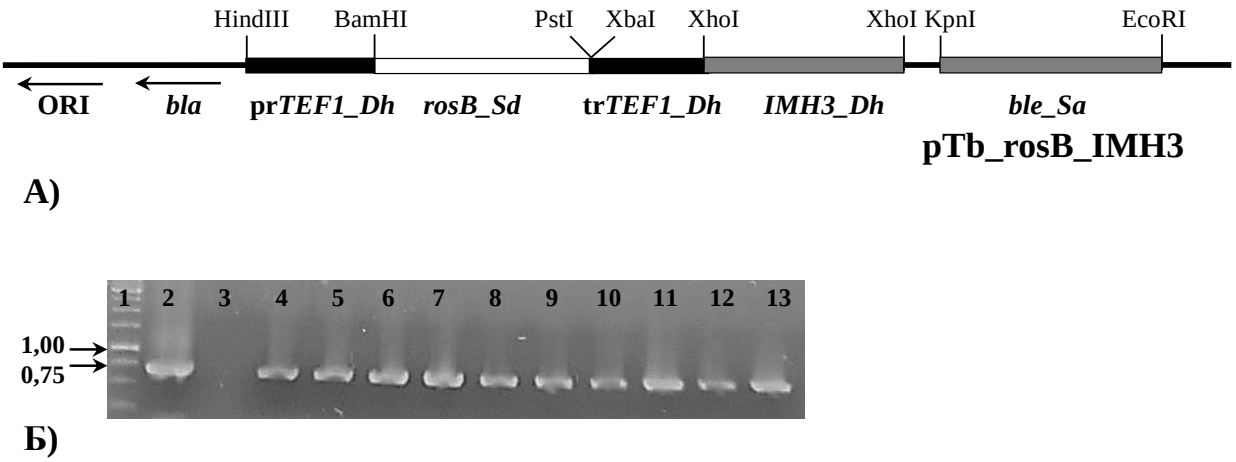


Рис. 3.10. А) Лінійна схема плазміди pT_rosB_IMH3. Точка початку реплікації ORI та ген стійкості до ампіциліну (*bla*) – стрілки; промотер та термінатор гену *TEF1 D. hansenii* позначені як чорні прямокутники; оптимізована версія гена *rosB S. davawensis* як білий прямокутник; гени *D. hansenii IMH3* та *S. aureus ble* для селекції трансформантів на середовищі МФК та резистентності до флеоміцину позначені як сірі прямокутники. **Б)** Електрофореграма ПЛР аналізу трансформантів *C. famata* плазмідою pT_rosB_IMH3. Доріжки 4-14 трансформанти *C. famata*. Доріжка 2 представляє позитивний контроль (плазміда pT_rosB_IMH3), в той час як 3 – негативний контроль (хромосомна ДНК вихідного штаму *C. famata*). 1 маркер молекулярної маси фрагментів (маса фрагментів представлена в т.п.н.).

5% Na_2HPO_4. Розділені фракції флавінів було проаналізовано відповідно до коефіцієнту відставання та кількісно оцінено спектрофотометричним аналізом (Табл. 3.1, Рис. 3.11).

Табл. 3.1.

Спектрофотометричний аналіз продукції флавінів у штамах трансформантів та контролів. Представлені значення загальної кількості флавінів і хроматографічно розділених фракцій флавінів.

	C.famata **FMN-13 (контроль)**	***C.famata*** **FMN-13 pUC57-IMH3 (контроль)**	***C.famata*** **FMN-13 pUC57-rosB-IMH3 (# 1/3)**	***C.famata*** **FMN-13 pUC57-rosB-IMH3 (# 1/4)**	***C.famata*** **FMN-13 pUC57-rosB-IMH3 (# 1/5)**
Загальні флавіни (мг/л)	104,20±3,05	89,23±2,78	93,74±1,98	44,83±0,77	38,75±0,87
ФМН	42,50±1,12	20,54±0,45	16,55±0,75	10,44±0,34	9,37±0,11
РФ	21,03±0,54	18,24±0,32	20,78±0,89	8,42±0,21	6,25±0,12
АФ	0,10±0,00	0,31±0,01	5,21±0,09	4,56±0,12	4,36±0,09
Біомаса (г/л)	8,00±0,19	7,64±0,08	7,03±0,07	6,91±0,23	6,92±0,19
Передбачуваний вихід АФ (мг/г клітин)	0,01±0,00	0,04±0,00	0,74±0,02	0,58±0,01	0,62±0,02

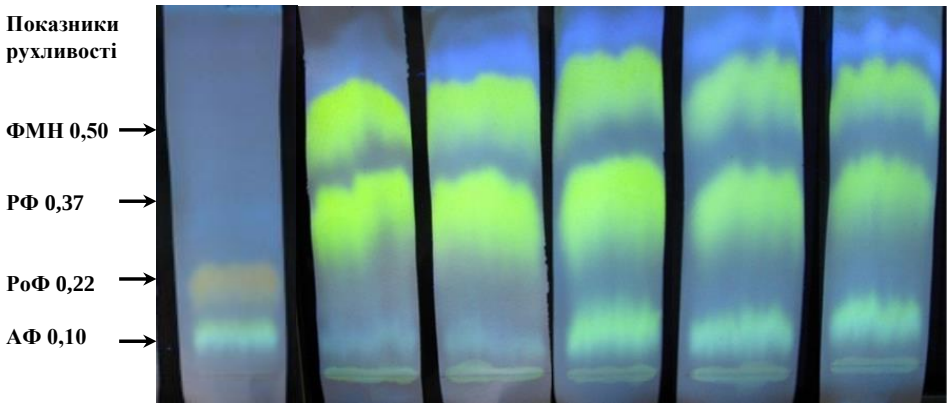


Рис. 3.11. Хроматографічне розділення фракцій флавінів в культуральному середовищі: 1 - *S. davawensis*; 2-3 - контролі (*C. famata* #13, його похідний, що містить плазміду без експресійної касети *rosB*); 4-6 - *rosB* трансформанти плазмідою pT_rosB_IMH3 (# 1/3; 1/4; 1/5).

3.6. Ідентифікація АФ

Хроматографічний аналіз виявив нову фракцію флавіну у проаналізованих трансформантів, що містять касету експресії гена *rosB*. Рухливість нової фракції відповідала коефіцієнту затримки для АФ (0,10) [Juri et al., 1987]. Рухливість цієї фракції відповідала рухливості фракцією з культурального середовища *S. davawensis,* даючи пік поглинання при 480 нм, що відповідає АФ [Tyagi et al., 2009].

Для отримання прямого доведення, що нова сполука, яка синтезується сконструйованими рекомбінантними штамами, відповідає АФ, було проведено масспектрометричний аналіз. ECI-MC спектр амінорибофлавіну з елементним складом $C_{16}H_{19}N_5O_6$ (Рис. 3.12.a) показав інтенсивно протонований молекулярний іон [M + H] із m/z 378 (елементний склад $C_{16}H_{20}N_5O_6$). В режимі негативної іонізації, було знайдено молекулярний іон [M - H] з m/z 376 та елементним складом $C_{16}H_{18}N_5O_6$. Після MC-MC фрагментації амінорибофлавіну було помічено амінолюміхром з молекулярною масою m/z 244 (Рис. 3.12.b та 3.12.c) замість 243 m/z люміхрому, який утворюється після фрагментації рибофлавіну [Flieger et al. 2016]. Більше того, фрагментація батьківського іона показала наявність іона 135 m/z, похідного від чотиригідроксильного п’ятивуглецевого ланцюга, та іона 361 m/z, утвореного фрагментацією іона-попередника. Ідентифікація іона при 361 m/z свідчила про вилучення аміногрупи з молекули амінорибофлавіну. Більше того, фрагментація амінолюміхрому (244 m/z) з амінорибофлавіну представила іон масою 172,8 (Рис. 3.12.b) або 172,9 (Рис. 3.123.c).

Отримані результати свідчать про те, що метильна група рибофлавіну була замінена на аміногрупу в амінорибофлавіні, після чого дріжджові клітини продукували амінорибофлавін.

На основі хроматографічного аналізу, за допомогою HPLC-DAD системи, було ідентифіковано сполуку з часом виходу 3,373 хв (Рис. 3.13.a). Більше того, УФ-видимий спектр для цього піку (Рис. 3.13.b) має таку саму форму (з максимумом при 253 та 475 нм) як амінорибофлавін [Jankowitsch et al. 2011],

похідний рибофлавіну з третинною аміногрупою. З іншого боку, УВЕРХ-МС аналіз показав тільки один пік (Рис. 3.14) при зборі даних для дочірнього іону з 244 m/z, отриманому при фрагментації молекулярного іона з 378 m/z.

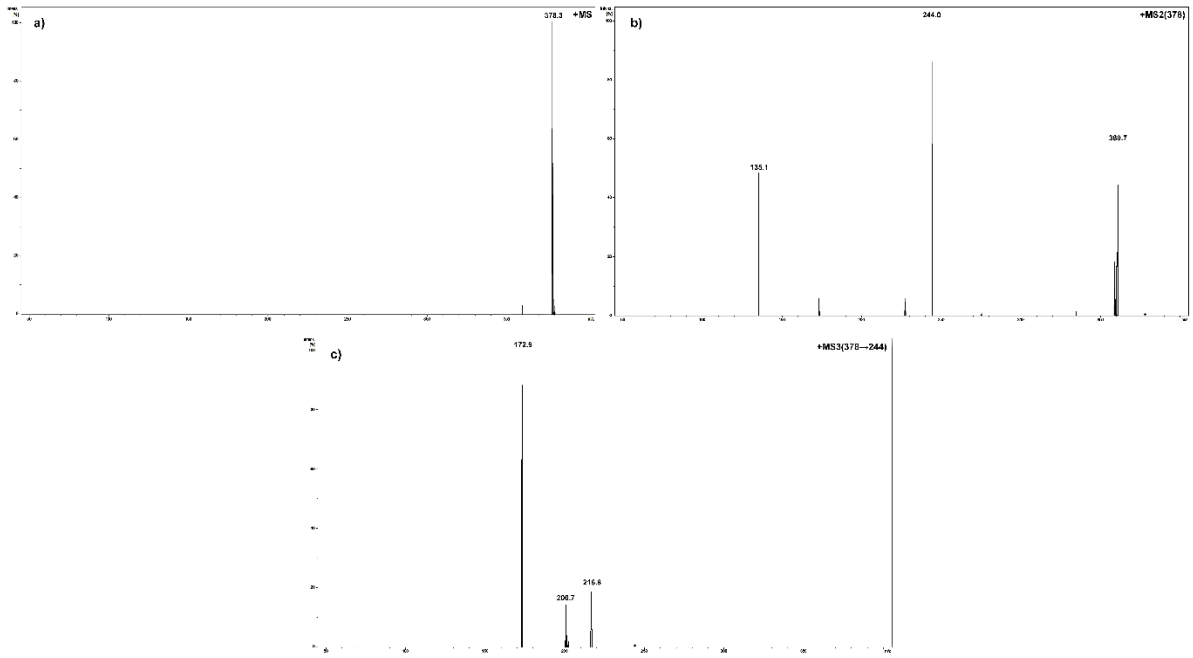


Рис. 3.12. Результати мас- аналізу та фрагментації амінорибофлавіну продукованого *C. famata*; **a)** Позитивна іонізація [M+H] молекулярного іона амінорибофлавіну; **b)** МС-МС фрагментація амінорибофлавіну в позитивному стані; **c)** Фрагментація іона з m/z 244 (амінолюміхром), отриманого при позитивній фрагментації молекулярного іона.

АФ в трансформантах дріжджів накопичувався в кількостях до 5,2 мг/л після 44 год культивації. Коротший чи довший час культивації негативно впливав на вихід АФ. Незважаючи на відносно не високу продукцію АФ, отримані результати є першою вдалою спробою конструювання дріжджового штама продуцента АФ.

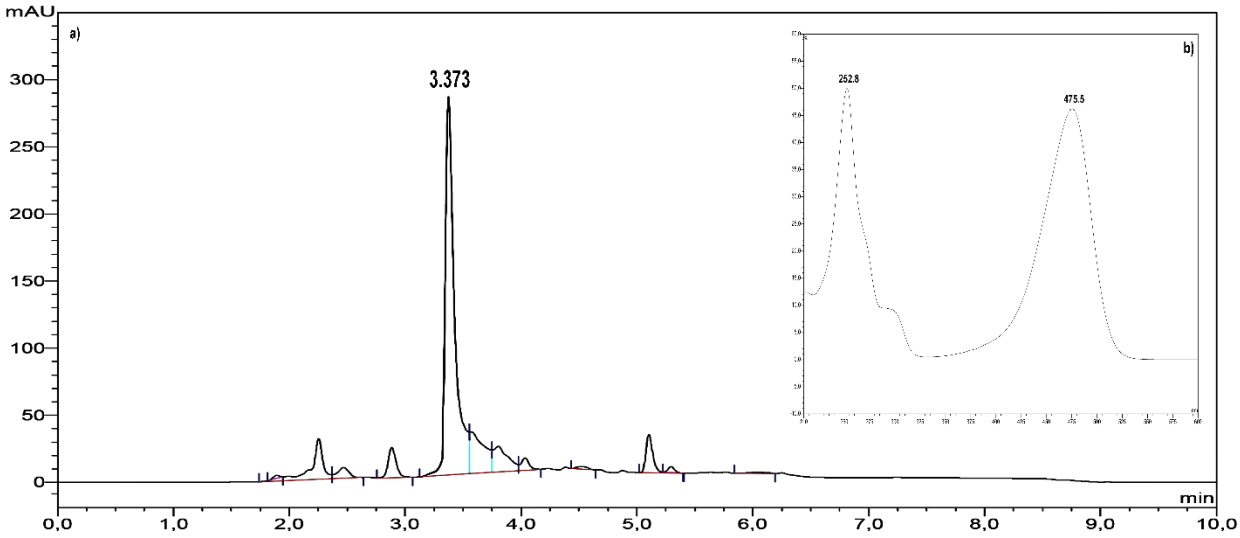


Рис. 3.13. Ідентифікація амінорибофлавіну за допомогою HPLC-DAD; **a)** Хроматограма відокремлення амінорибофлавіну; **b)** УФ-видимий спектр відокремленого амінорибофлавіну.

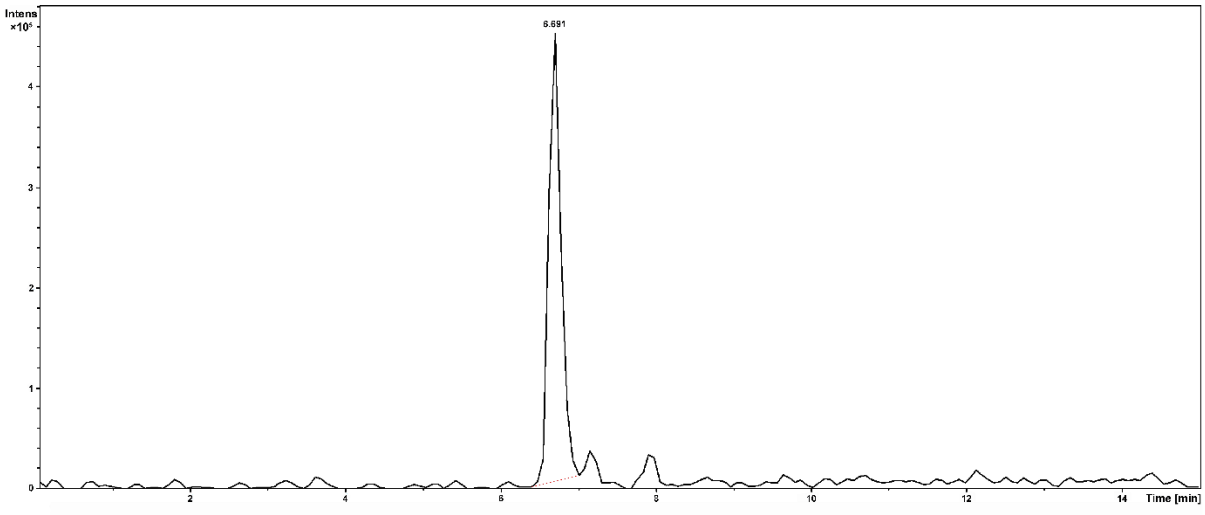


Рис. 3.14. Хроматограма тандемної УВЕРХ мас-спектрометрії амінорибофлавіну, зібраного з дочірнім іоном при 244 m/z.

3.7. Конструювання продуцентів РоФ на основі дріжджів *C. famata*

Для отримання продуцента розеофлавіну плазміда pFMN1/rosB/rosA/IMH3, що містить касети експресії генів *FMN1, rosB, rosA* під контролем сильного промотора гена *TEF1* було введено у надпродуценти рибофлавіну AF4 та #91. Перед трансформацією вектор pFMN1/rosB/rosA/IMH3 було лінеаризовано ендонуклеазою рестрикції AatII. Селекцію трансформанітв проводили на середовищі з додаванням МФК у концентрації 20 мг/л. Було отримано декілька трансформантів. Трансформанти стабілізували шляхом культивування на неселективному поживному середовищі YPD з подальшим їх перенесенням на селективне середовище з МФК. Наявність касет експресії генів *FMN1, rosB, rosA* у геномі стабілізованих трансформантів перевіряли за допомогою ПЛР. Було використано наступні пари праймерів: Ko825 GAT TAC GCC AAG CTT TAA CGA ACA GCT CAT CAG ATT TAC / Ko826 TTA GTC GAC AAG CTT ATA CAT AAT ACC TTA AGT AAA AGT ACC, що комплементарні касеті експресії *FMN1* з очікуваною величиною ампліфікованого фрагмента 1525 п.н.; Ko827 GTA TAA GCT TGT CGA CTA ACG AAC AGC TCA TCA GAT TTA C / Ko830 GGC CCG TCG ACA TGT TGC GCC GAA CAA TCA CAT що комплементарні касеті експресії *rosB* з очікуваною величиною ампліфікованого фрагмента 1740 п.н.; Ko833 GGT ACC GGA TCC TAA CGA ACA GCT CAT CAG ATT TAC / Ko836 GCT CGG TAC CAT GTT GCG CCG AAC AAT CAC AT що комплементарні касеті експресії *rosA* з очікуваною величиною ампліфікованого фрагмента 2018 п.н. На Рис. 3.15 представлено результати ПЛР аналізу, що підтверджують наявність відповідних касет експресії в геномі стабілізованих

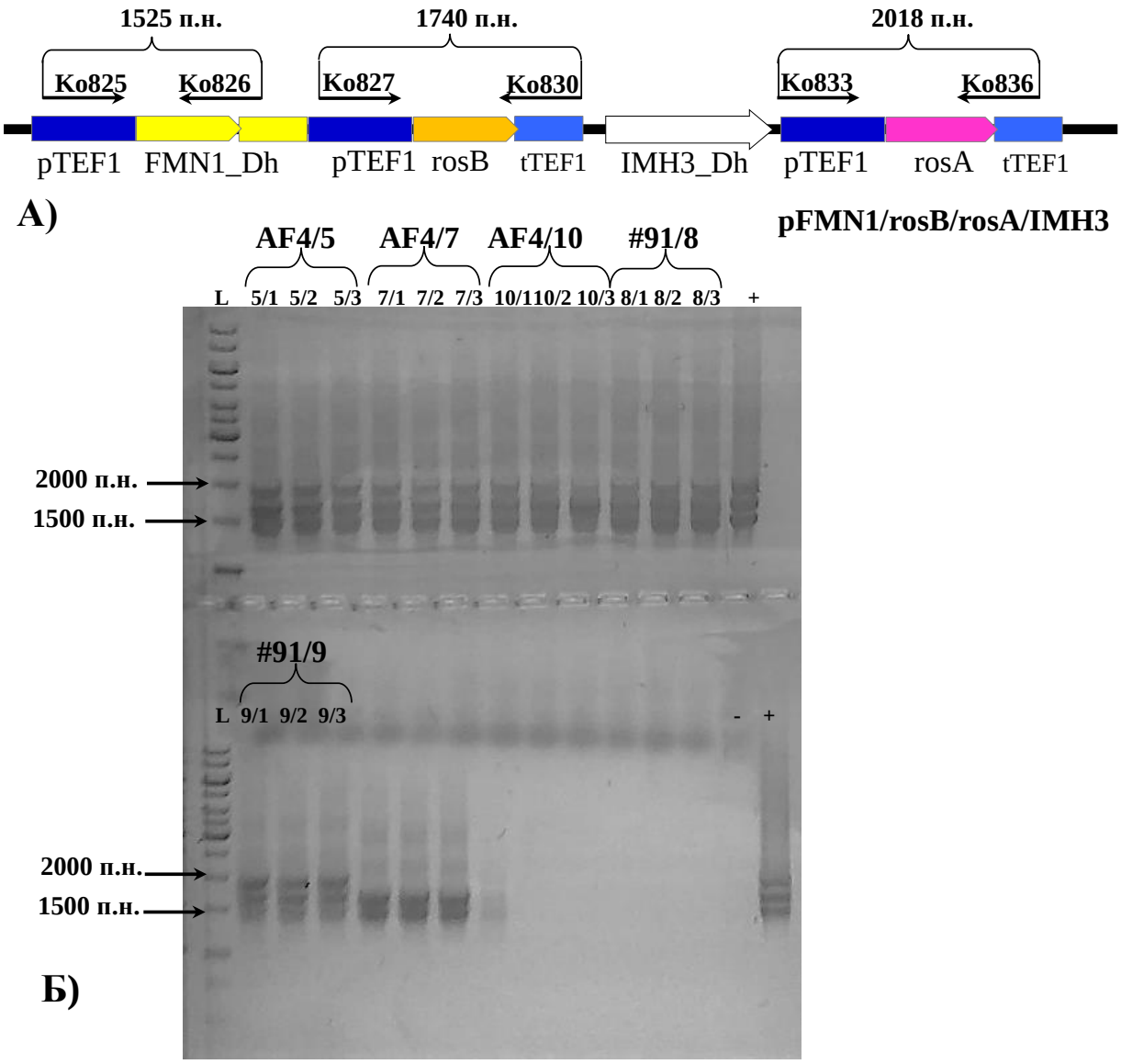


Рис. 3.15. А) Лінійна схема плазміди pFMN1/rosB/rosA/IMH3 (10459 п.н.). Синім відрізками позначено промотор гена *TEF1 C. famata*, блакитним відрізком позначено термінатор гена *TEF1 D. hansenii*, жовтим, помаранчевим та рожевим відрізками позначено гени *FMN1 D. hansenii,* адаптований гени *rosB* та *rosA S. davaonensis*, відповідно. **Б)** Електрофореграма ПЛР аналізу стабілізованих трансформантів штамів AF4/5, AF4/7, AF4/10 та #91/8, #91/9 дріжджів *C. famata*, що містять інтегровану в геном плазміду pFMN1/rosB/rosA/IMH3. При аналізі кожного штаму використовували по три незалежні колонії. Стрілочками позначено відповідні праймери. – негативний

контроль, + позитивний контроль (в ПЛР було використано плазміду pFMN1/rosB/rosA/IMH3 як матрицю). L – маркер молекулярної ваги.

трансформантів AF4/5, AF4/7, AF4/10, #91/8, #91/9, оскільки величини ампліфікованих фрагментів чітко збігаються з величинами очікуваних фрагментів. Для кожного стабілізованого штаму аналізували три незалежні колонії.

Для перевірки здатності отриманих трансформантів продукувати РоФ було проведене їх культивування в середовищі YPD та YNB. Однак отримані трансформанти РоФ не продукували. Ми висуваємо припущення, що було проаналізовано недостатню кількість селекціонованих рекомбінантних штамів.

Для отримання більшої колекції трансформантів було використано альтернативний селективний маркер, ген *SAT*, що забезпечує резистентність до антибіотика норзеотрицину. Ген *SAT* було ампліфіковано з плазміди pTb/R6/NTC з використанням пари праймерів Ko1062 ACA TGT CGA CGG GCC CAG TCT TAT ATA TAT CCG AAC TTG G та Ko1063 TCC GGT ACC GGG CCC TCA CAT AAC CAC AAG GTG CC. Ген *SAT* було оброблено рестриктазою ApaI. Як вектор було використано плазміду pFMN1/rosB/rosA/IMH3, гідролізовану тою самою рестриктазою. Для відділення гену *IMH3* було проведено елюцію вектора pFMN1/rosB/rosA. Після дефосфорилювання вектора pFMN1/rosB/rosA було здійснено його лігування з геном *SAT*. Сконструйовані плазміди pFMN1/rosB/rosA/NTC (Рис. 3.16.А). аналізували за допомогою рестрикційного аналізу з використанням ендонуклеаз рестрикції HinfI, KpnI (очікувані фрагменти 3566, 2368, 1998, 1648 п.н.), BamHI (6146, 2806, 664 п.н.), AatII (9616 п.н.), ApaI (7886, 1730 п.н.), HindIII (6060, 2055, 1501 п.н. при прямій орієнтації геном *SAT* та 4972, 3143, 1501 п.н. при зворотній орієнтації). Отримані після рестрикції величини фрагментів відповідали очікуваним фрагментам (Рис. 3.16.Б, В).

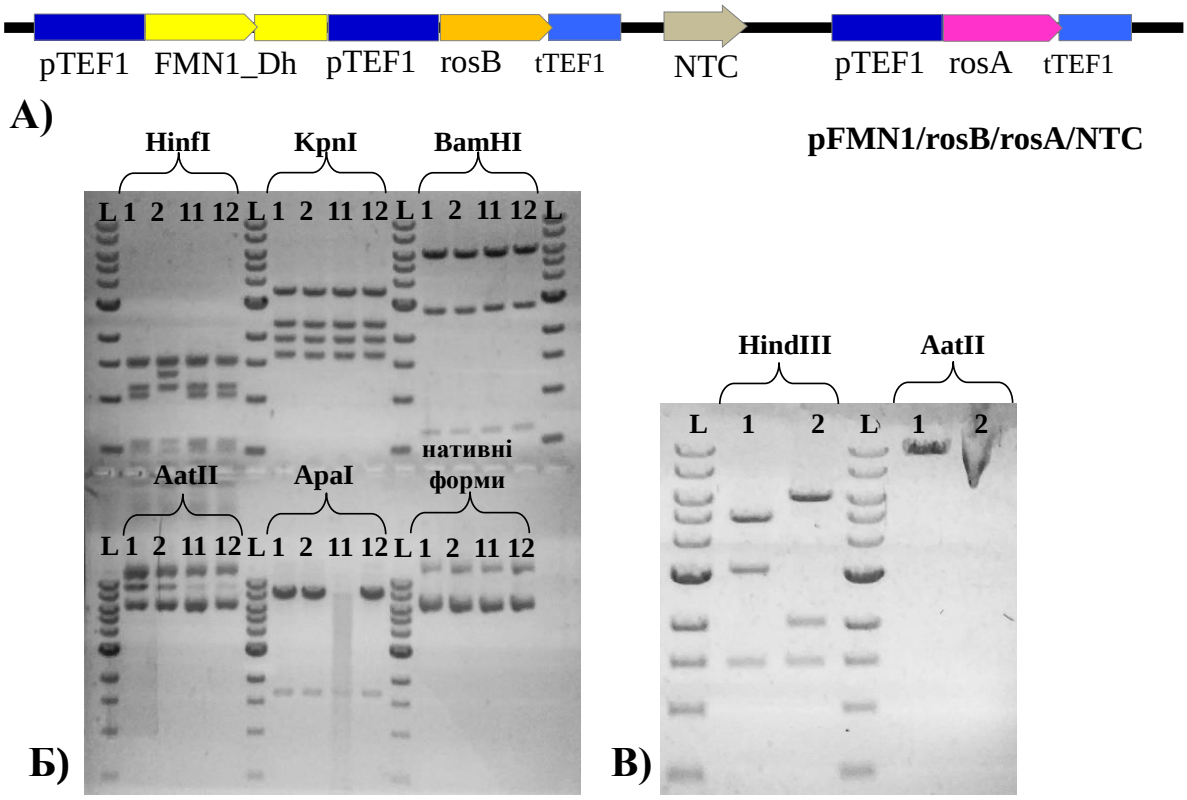


Рис. 3.16. А) Лінійна схема плазміди pFMN1/rosB/rosA/NTC (9616 п.н.). Синім відрізками позначено промотор гена *TEF1 C. famata*, блакитним відрізком позначено термінатор гена *TEF1 D. hansenii*, жовтим, помаранчевим та рожевим відрізками позначено гени *FMN1 D. hansenii,* адаптований гени *rosB* та *rosA S. davaonensis*, відповідно. **Б)** та **В)** Електрофореграми рестрикційного аналізу плазмід pFMN1/rosB/rosA/NTC 1, 2, 11, 12; L – маркер молекулярної ваги. Вектор 2 має пряму орієнтацію гена *SAT*, тоді як вектори 1, 11, 12 – зворотну.

Сконструйований вектор pFMN1/rosB/rosA/NTC, що містить маркерний ген *SAT* та гени синтезу розеофлавіну *FMN1, rosB, rosA* було лінеаризовано рестриктазою AatII та введено у надпродуценти рибофлавіну AF4 та #91 шляхом електротрансформації. Селекцію трансформантів проводили на середовищі YPD з додавання антибіотика норзеотрицину у концентрації 20, 40 та 100 мг/л. Частота трансформації становила близько 100 трансформантів/мкг плазмідної ДНК на середовищі з 20 мг/л норзеотрицину. Було проаналізовано понад сто

трансформантів. Наявність цільової плазміди в геномі рецинієнтних штамах підтверджували за допомогою ПЛР з використанням праймерів, що підтверджують наявність касет експресії генів *FMN1, rosB, rosA.* В одній ПЛР використовували чотири праймери, Ko1058 GTA AAT AGG GTA CAG CCC TAT C, гомологічний до промотора гена *TEF1 C. famata*, Ko1059 TCT CGG GTG TGT TCT GAT ATG – до гена *FMN1*, Ko1060 CAG CAG GTC CTA ACC AAT ATG – до гена *rosB,* та Ko1061 CCC ATA GCC TGA CGT ATT CTA A – до гена *rosA.* В результаті ПЛР очікувані фрагменти мали би відповідати величинам 407 п.н., 691 п.н., та 1007 п.н., відповідно. Як зображено на Рис. 3.17, деякі з трансформантів, зокрема, 1, 5, 6, 8, 9, 10, 12 виявляли три касети експресії, оскільки з їх геномів ампліфікувалися три фрагменти очікуваної величини 407 п.н., 691 п.н., та 1007 п.н.

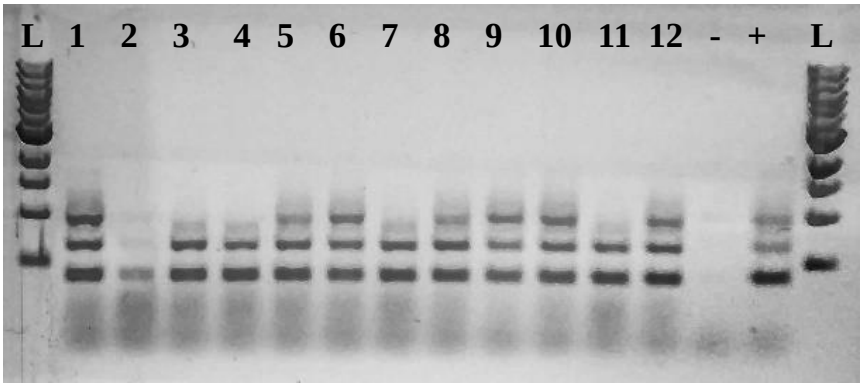


Рис. 3.17. Електрофореграма ПЛР аналізу трансформантів штаму #91дріжджів *C. famata*, що містять інтегровану в геном плазміду pFMN1/rosB/rosA/NTC з використанням праймерів Ko1058, Ko1059, Ko1060 та Ko1061. Трансформанти 1, 5, 6, 8, 9, 10, 12 містять три касети експресії. – негативний контроль, + позитивний контроль (в ПЛР було використано плазміду pFMN1/rosB/rosA/NTC як матрицю). L – маркер молекулярної ваги.

Для перевірки здатності отриманих трансформантів продукувати РоФ було проведене їх культивування в середовищі YPD та YNB. Було проаналізовано більше сотні трансформантів, однак продукції розеофлавіну не спостерігали. Ідентифіковано новий ген шляху синтезу розеофлавіну *rosC*, що кодує фосфатазу, яка перетворює 8-диметил-8-амінорибофлавін фосфат до 8-диметил-8-амінорибофлавіну. Ми висунули припущення, що введення гена *rosC* може бути критичним для синтезу РоФ у дріжджів *C. famata*.

3.8. Клонування гена *rosC* для експресії у дріжджів *C. famata*

Особливістю геному *S. davaonensis* полягає у високому вмісту GC-пар, що сягає 70,6% [Jankowitsch et al., 2012]. Геном дріжджів *C. famata* містить близько 36%. Отже, для ефективної експресії гена *rosC S. davaonensis* в системі *C. famata* та *Pichia pastoris* необхідна адаптація їх послідовності. Адаптація генів проводилась за допомогою ресурсу http://atgme.org/ Для подальшого конструювання цільових касет експресії з послідовностей генів було виключено послідовності, що впізнаються рестриктазами EcoRI (GAATTC) KpnI (GGTACC), BamHI (GGATCC), PstI (CTGCAG) (Рис. 3.18).

Синтетичний ген *rosC S. davaonensis*, адаптований для експресії в *C. famata* було ампліфіковано за допомогою пари праймерів Ko1075 CGC GGA TCC ATG TCT GAT GGT AGA GAA TCT TTT TTA G / Ko1076 GCA CTG CAG TTA AAT AAC ATC AGA TGG AGC AGC AG. Фрагмент, що містить ген *rosC* було оброблено рестриктазами BamHI та PstI та клоновано до складу плазміди pUC57_CfTEF1_DhTEF1tr_Ble_Sa використовуючи ці ж рестриктази між промотором гена *TEF1 C. famata* та термінатором гена *TEF1 D. hansenii*. На наступному етапі, касету експресії, що містить промотор гена *TEF1 C. famata*, ген *rosC S. davaonensis* та термінатор гена *TEF1 D. hansenii* було ампліфіковано за допомогою пари праймерів Ko1077 CCG GAA TTC AAA TTG ACT GGT CTG AAA TAA TAG / Ko1078 CCG GAA TTC GAT TAT TGA CTC GAG ATG TTG C та попередньо сконструйованої плазміди як матриці. Отриманий ПЛР-

фрагмент було оброблено рестриктазою EcoRI та клоновано у EcoRI-лінеаризовану та дефосфорильовану плазміду pFMN1/rosB/rosA/NTC. В

>rosC_Streptomyces_davaonensis_optimized_for_C.famata_ATGme
ATGTCTGATGGTAGAGAATCTTTTTTAGAAGTTATGAGATCTGTTTATGAAAGATATTTAGTTGGTGTTCCAGGTGTT
TCTGAAGTTTGGTTAATTAGACATGCTGATTCTTATACTGGTTTAGAAGATTATGATGGTGATCCAAGAGATCCAGCT
TTATCTGAAAAAGGTAGAGCTCAAGCTAGATTATTAGCTGCTAGATTAGCTGGTGTTCCATTACATGGTGTTTGGGCT
TCTGGTGCTCATAGAGCTCAACAAACTGCTTCTGCTGTTGCTGCTGAACATGGTTTAAGAGTTAGAACTGATGCTAGA
TTAAGAGAAGTTAGAACTAATTGGGATGATGGTAGACCATCTGAATTAAAACCACATGGTGTTTATCCATTTCCAGAA
CCAGAAAAAGAAGTTGCTGAAAGAATGAGAACTGCTGTTACTGCTGCTGTTGCTGCTACTCCACCAGCTCCAGATGGT
ACTACTAGAGTTGCTGTTGTTGGTCATGATTCTGCTTTAGTTATTTTAATGGGTTCTTTAATGAATTTAGGTTGGGGT
CAATTAGATATGATTTTACCATTAACTTCTGTTTCTGTTTTAGCTGTTAAAGATGAAAGAATGGTTGTTAGATCTATT
GGTGATGCTACTCATTTAGCTGCTGCTCCATCTGATGTTATT**TAA**

>rosC_Streptomyces_davaonensis_optimized_for_P.pastoris_ATGme
ATGTCTGATGGTAGAGAATCTTTTTTGGAAGTTATGAGATCTGTTTACGAAAGATACTTGGTTGGTGTTCCAGGTGTT
TCTGAAGTTTGGTTGATTAGACATGCTGATTCTTACACTGGTTTGGAAGATTACGATGGTGATCCAAGAGATCCAGCT
TTGTCTGAAAAGGGTAGAGCCCAAGCTAGATTGTTGGCTGCTAGATTGGCTGGTGTTCCATTGCATGGTGTTTGGGCT
TCTGGTGCTCATAGAGCCCAACAAACTGCTTCTGCTGTTGCTGCTGAACATGGTTTGAGAGTTAGAACTGATGCTAGA
TTGAGAGAAGTTAGAACTAACTGGGATGATGGTAGACCATCTGAATTGAAGCCACATGGTGTTTACCCATTTCCAGAA
CCAGAAAAGGAAGTTGCTGAAAGAATGAGAACTGCTGTTACTGCTGCTGTTGCTGCTACTCCACCAGCTCCAGATGGT
ACTACTAGAGTTGCTGTTGTTGGTCATGATTCTGCTTTGGTTATTTTGATGGGTTCTTTGATGAACTTGGGTTGGGGT
CAATTGGATATGATTTTGCCATTGACTTCTGTTTCTGTTTTGGCTGTTAAGGATGAAAGAATGGTTGTTAGATCTATT
GGTGATGCTACTCATTTGGCTGCTGCTCCATCTGATGTTATT**TAA**

Рис. 3.18. Послідовності генів *rosC S. davaonensis* із модифікованими кодонами для експресії в системі *C. famata* та *P. pastoris* з вилученням послідовностей, що впізнаються рестриктазами EcoRI (GAATTC) KpnI (GGTACC), BamHI (GGATCC), PstI (CTGCAG). Старт- і стоп-кодони виділені жирним шрифтом

результаті було сконструйовано плазміду, що отримала назву pFMN1/rosABC/NTC. Коректність сконструйованої плазміди було перевірено секвенуванням. Вектор pFMN1/rosABC/NTC було лінеаризовано рестриктазою AatII та введено у надпродуцент рибофлавіну #91 шляхом електротрансформації. Селекцію трансформантів проводили на середовищі YPD з додавання 100 мг/л норзеотрицину. Було селекціоновано колекцію трансформантів. Наявність цільової плазміди в геномі рецинієнтних штамах підтверджували за допомогою ПЛР з використанням праймерів, що підтверджують наявність касет експресії

генів *FMN1, rosB, rosA* та *rosC.* В одній ПЛР використовували чотири праймери, Ko1058, Ko1059, Ko1060, та Ko1061. А також пару праймерів Ko1058 / Ko1079 CTA AAC CAG TAT AAG AAT CAG CAT G (гомологічний послідовності гена *rosC*). В результаті ПЛР очікувані фрагменти мали би відповідати величинам 407 п.н., 691 п.н., та 1007 п.н., відповідно, а також фрагмент величиною 310 п.н. Як зображено на Рис. 3.19, трансформанти, зокрема, 5, 7, 9 виявляли чотири касети експресії, оскільки з їх геномів в результаті ПЛР ампліфікувались чотири фрагменти очікуваної величини 407 п.н., 691 п.н., 1007 п.н. та 310 п.н.

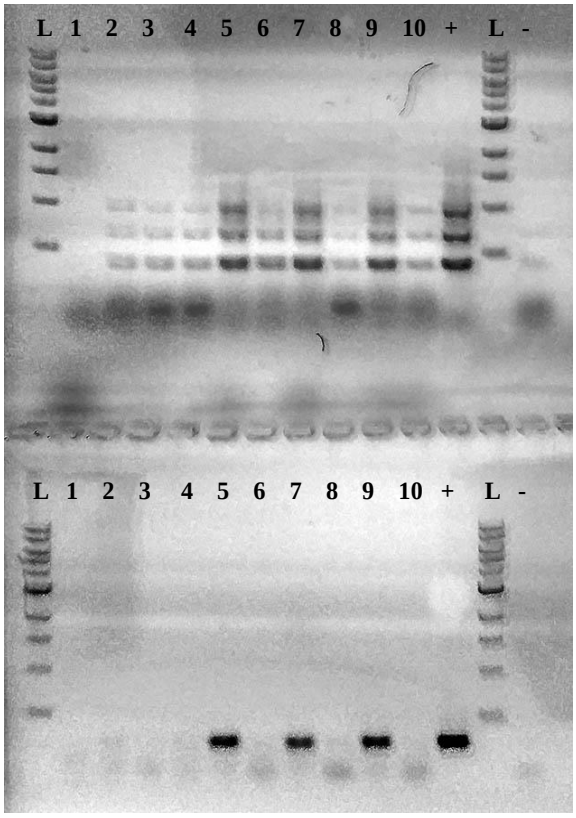


Рис. 3.19. Електрофореграма ПЛР аналізу трансформантів штаму #91 дріжджів *C. famata*, що містять інтегровану в геном плазміду pFMN1/rosABC/NTC з використанням праймерів Ko1058, Ko1059, Ko1060, та Ko1061 (верхній ряд) та Ko1058, Ko1079 (нижній ряд). Трансформанти 5, 7, 9 містять чотири касети експресії. – негативний контроль, + позитивний контроль (в ПЛР було використано плазміду pFMN1/rosABC/NTC як матрицю). L – маркер молекулярної ваги.

3.9. Генетична та біохімічна характеристика штамів *C. famata* з посиленою експресією генів *FMN1, rosB, rosA* та *rosC*

Експресію генів *FMN1, rosB, rosA* та *rosC* у трансформантів #5 та #9 було визначено за допомогою ПЛР у реальному часі. У роботі були використані наступні пари праймерів FMN1_qFCf TTT CCT ATG GTT ATG TCT ATT GG /

FMN1_qRCf AAT TCT GGT CTG ATA TAC CCC; rosA_qFCf GAG AAT TAG GTA AGG TCC TTG / rosA_qRCf CAG TTC CTC TAC ATT CTA TAA C; rosB_qFCf ATA TTG GTT AGG ACC TGC TG / rosB_qRCf TGT AAG GTG TCT CTT GAA GC; rosC_qF CTG TTG TTG GTC ATG ATT CTG / rosC_qR GAG TAG CAT CAC CAA TAG ATC, а також пара праймерів для нормалізації отриманих результатів, що гомологічні послідовності гена ACT1 (ACT1_qFDh ATG AAG TGT GAT GTC GAT GTC / ACT1_qRDh TTT GAG ATC CAC ATT TGT TGG AA). Встановлено, що експресія генів *FMN1, rosA, rosB, rosC* у трансформантів Cf#5 та Cf#9 була підвищена в 55, 35, 27, 49 та 65, 37, 20, 43 разів, відповідно (Табл. 3.2)

Табл. 3.2.

Експресія генів *FMN1, rosA, rosB, rosC* у трансформантів Cf#5 та Cf#9 після їх культивування в середовищі YPD упродовж однієї доби

	Гени			
ΔΔCt	*FMN1*	*rosA*	*rosB*	*rosC*
#91 (вихідний)	1	-	-	-
Cf#5	55±2	35±2	27±1	49±2
Cf#9	65±3	37±2	20±1	43±2

мРНК було нормалізовано до мРНК гена *ACT1*

Наступне завдання полягало у визначенні питомої активності N,N-8-деметил-8-аміно-D-рибофлавін диметилтрансферази (RosA), що каталізує останню реакцію диметилювання N,N-8-деметил-8-аміно-D-рибофлавіну (АФ) до антибіотика розеофлавіну (РоФ). АФ зазнає метилювання амінної групи із залученням S-аденозилметіоніну. В результаті реакції формується РоФ та S-

аденозилгомоцистеїн. Фермент RosA виділено із *Streptomyces davaoencis,* проведено його очистку та досліджено кінетичні та структурні параметри [Jankowitsch et al., 2011]. У літературі відсутні відомості про визначення активності цього ферменту у дріжджів. Для визначення активності RosA у трансформантів дріжджів *C. famata* з посиленою експресією генів *FMN1, rosA, rosB, rosC* необхідно адаптувати метод визначення активності RosA у стрептоміцетів до дріжджів. Підбір умов проведення ферментативної реакції проводили для гетерологічного RosA ферменту у штаму дріжджів *P. pastoris* #9 (*FMN1, rosA, rosB*), здатного до надсинтеу РоФ.

Ферментативну реакцію проводили в суміші об'ємом 1 мл, що містила 2 мМ SAM та різні концентрації АФ: 200мкМ; 2 мМ; 5 мМ. Суміш було преінкубовано 5 хв при 37°С. Реакцію розпочинали додаванням SAM. Інкубація тривала 90 хв. Кількість синтезованого продукту реакції РоФ визначали за допомогою HPLC-DAD. На рисунку 3.11 представлено активність RosA у штаму *P. pastoris* #9 (Pp#9) при різних концентраціях субстрату АФ в реакційній суміші. Як видно із рисунка 3.20, підвищення концентрації АФ з 200 мкМ до 5 мМ приводило до зростання активності ферменту майже в 15 разів. Наявність у реакційній суміші інших додатків - дитіотрийтолу (DTT) – 3 мМ та $MgCl_2$ – 1,2 мМ призводило до зниження питомої активності при всіх вище вказаних концентраціях АФ. Досліджували також вплив температури інкубації реакційної суміші на швидкість ферментативної реакції. Як видно із рис. 3.21 підвищення температури інкубації із 30°С до 37°С приводило до суттєвого зростання RosA активності (в 2-5 раза). Виходячи з отриманих нами результатів, наступні визначення активності RosA ферменту у дріжджів проводили за наступних умов: інкубаційна суміш містила 5 мМ АФ, 2 мМ SAM, температура інкубації 37°С.

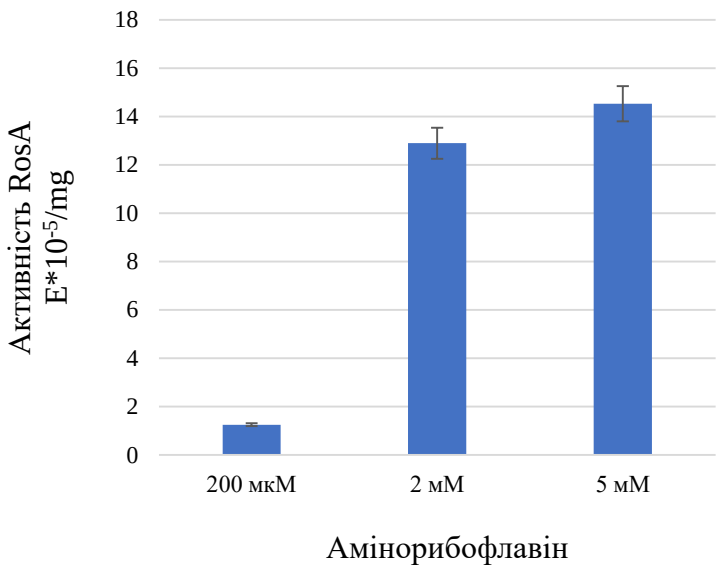


Рис. 3.20. Активність RosA у штаму Pp#9 при різних концентраціях субстрату АФ в реакційній суміші

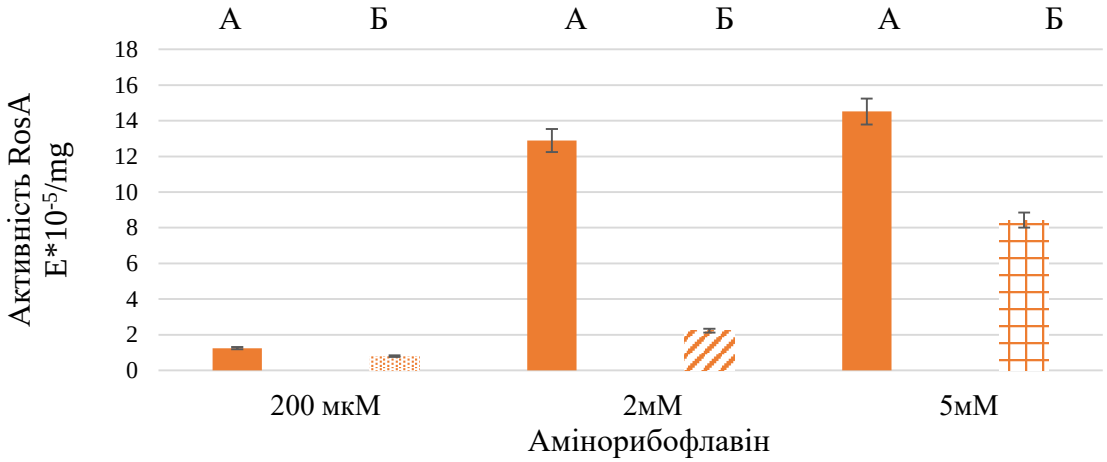


Рис. 3.21. Питома активність RosA у штаму Pp#9 при температурах інкубації реакційної суміші: 37 °C (А) та 30°C (Б), що містила різні концентрації амінорибофлавіну (200 мкМ; 2 мМ; 5 мМ)

Згідно опрацьованого протоколу було визначено питому активність RosA у тарансформантів Cf#5 та Cf#9 та Pp#9. Як видно із рис. 3.22, активність RosA у штамів Cf#5 та Cf#9 не визначалась, тоді як активність RosA у Pp#9 становила 24 МО.

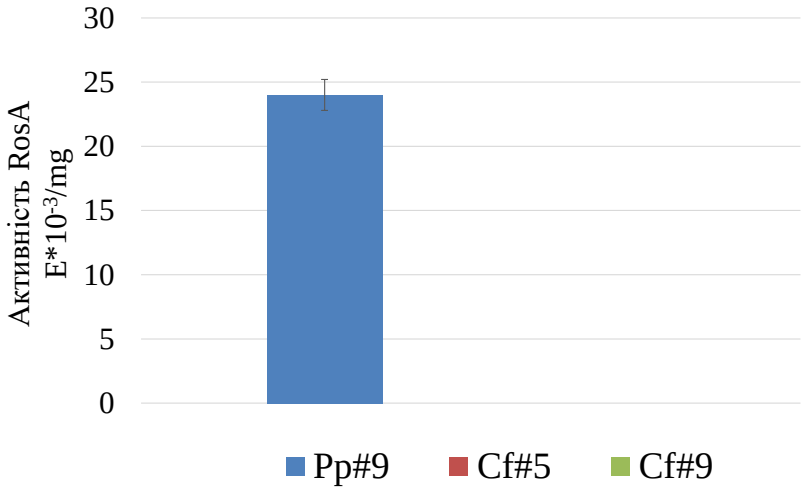


Рис. 3.22. Питома активність RosA у трансформантів дріжджів *C. famata* Cf#5, Cf#9 та *P. pastoris* Pp#9

Для перевірки здатності отриманих трансформантів продукувати РоФ було проведене їх культивування в середовищі YPD та YNB. Було проаналізовано штами Cf#5 та Cf#9, однак кількості розеофлавіну у культуральному середовищі, достатні для визначення за допомогою рідинної хроматографії високого тиску (HPLC-DAD), не виявлено. Отже, необхідною передумовою синтезу РоФ є наявність активності RosA.

3.10. Клонування гена *rosC* для експресії у дріжджів *P. pastoris*

Синтетичний ген *rosC S. davaonensis*, адаптований для експресії в *P. pastoris* було ампліфіковано за допомогою пари праймерів Ko1081 AAA ACA CCG AAT TCA TGT CTG ATG GTA GAG AAT CTT TTT TG / Ko1082 CTA AAG CGG TAC CTT AAA TAA CAT CAG ATG GAG CAG CAG. Як вектор було використано ПЛР продукт, отриманий за допомогою праймерів Ko1083 ATT TAA GGT ACC GCT TTA GTC AAA TAT TAA TCT ATT TCA CC / Ko1084 GAC ATG AAT TCG GTG TTT TGA TAG TTG TTC AAT TGA TTG та вектора BB2_L_CD_syn_BbsI_pGAP_rosA__RPS2TT як матриці. Обидва фрагменти було поєднано за допомогою асамблеї Гібсона. В результаті було сконструйовано плазміду, що містить ген *rosC* під контролем промотора гена *GAP1* та термінатора гена *RPS2 P. pastoris*.

Штамі *P. pastoris* #9 (Pp#9), сконструйований у нашій попередній роботі, здатний продукувати РоФ. Однак цей штам не містить вільних селективних маркерів. Для експресії гена *rosC* у штамі #9 необхідно розробити додаткові селективні маркери. Було вирішено використати ген *SUC2 S. cerevisiae*, що кодує інвертазу, та забезпечує селекцію трансформантів на середовищі з сахарозою.

Касету експресії *rosC*; ген *SUC2 S. cerevisiae*; вектор pUC57 та NTS (від nontranscribed spacers, послідовність, що забезпечує множинну інтеграцію цільової плазміди в локусі генів рибосомальної ДНК) було ампліфіковано за допомогою праймерів Ko1085 GAA TTC GAG CTC TTT TTT GTA GAA ATG TCT TGG TGT CC / Ko1086 ACT AGG GCC CCT CTA ATC CGG ACT GTC CAA AG; Ko1087 TTA GAG GGG CCC TAG TAA ACA GGG AGA TAC CGT AC / Ko1088 TAC GGT CGA CGT AAG GCA ACT ACA TTA CGA TTG TG; Ko1091 GTG GAC CTG CAG AGG CCT GCA TGC AAG CTT G / Ko1092 CAA AAA AGA GCT CGA ATT CAC TGG CCG TCG TTT TAC та Ko1089 CCT TAC GTC GAC CGT AAG CAA TCT GGA CAA TTA TGT AAG / Ko1090 CCT CTG CAG GTC CAC TAG GCC ACA AGA GTG, відповідно. Чотири ампліфіковані фрагменти після елюції було поєднано за допомогою асамблеї Гібсона. Коректність плазміди було перевірено секвенуванням. Плазміда отримала назву prosC/SUC2 (Рис. 3.23.А).

Перспективним селективним маркером для дріжджів є ген *IMH3*, що кодує інозинмонофосфат дегідрогеназу. Цей ген було успішно використано у нашій роботі для селекції трансформантів C. *famata* та *Ogataea polymorpha* [Bratiichuk D, et al., 2020]. Ген *IMH3 O. polymorpha* було ампліфіковано з хромосомної ДНК штаму NCYC495 з використанням пари праймерів Ko1140 TTA GAG CTC GAG CAA TTC GTC TTC TTC AAC AGA GTC / Ko1141 TTA CGC TCG AGG TTC ACA TCA GAA AGG TCA AGC TG. Вектор було ампліфікрвано з використанням пари праймерів Ko1142 GAT GTG AAC CTC GAG CGT AAG CAA TCT GGA CAA TTA TGT AAG / Ko1143 ACG AAT TGC TCG AGC TCT AAT CCG GAC TGT CCA AAG та плазміди prosC/SUC2 як матриці. Ампліфіковані фрагменти після було поєднано за допомогою асамблеї Гібсона. Коректність плазміди було

перевірено секвенуванням. Плазміда, що містить ген *IMH3* замість гена *SUC2* отримала назву prosC/IMH3 (Рис. 3.23.Б).

Ген *BSD* використовується у дріжджів як селективний маркер для відбору трансформантів на середовищі з додаванням антибіотика бластицидину, що блокує формування пептидного зв'язку на рибосомі. Ген *BSD* під контролем промотора та термінатора гена *TEF1 D. hansenii* було ампліфіковано з плазміди pBSD за допомогою пари праймерів Ko1147 ACG CGT CGA CGC TCC CCC CTA CCA AGC CTA C / Ko430 AAA TCT AGA GAT TAT TGA CTC GAG ATG TTG CGC CG. Вектор було ампліфіковано за допомого праймерів Ko1145 GCT CTA GAC GTA AGC AAT CTG GAC AAT TAT GTA AG / Ko1146 ACG CGT CGA CCT CTA ATC CGG ACT GTC CAA AG та плазміди prosC/SUC2 як матриці. Обидва ПЛР-фрагменти було оброблено рестриктазами XbaI та SalI та об'єднано у один вектор шляхом лігування з використанням Т4 ДНК лігази. Коректність плазміди було перевірено секвенуванням. Плазміда, що містить ген *BSD* замість гена *SUC2* отримала назву prosC/BSD (Рис. 3.23.В).

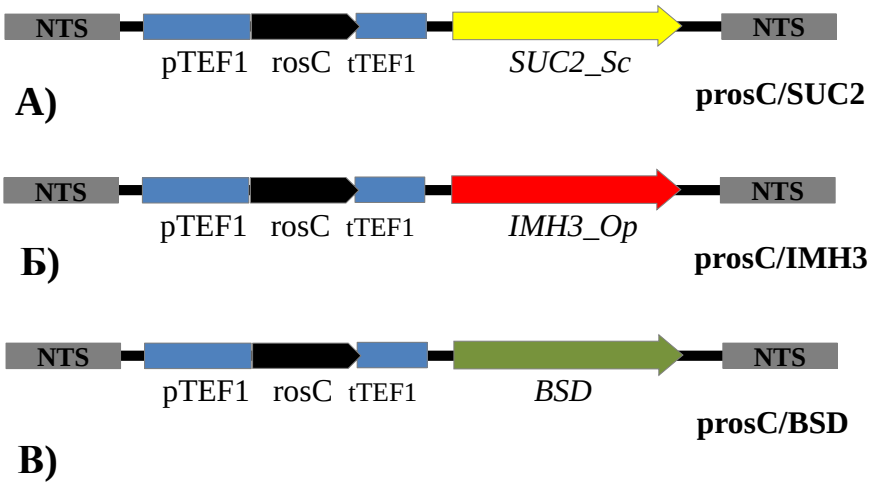


Рис. 3.23. Лінійні схеми плазмід **А)** prosC/SUC2, **Б)** prosC/IMH3, **В)** prosC/BSD. Синіми відрізками позначено промотор та термінаор гена *TEF1 D. hansenii*, жовтим, червоним та зеленим відрізками позначено гени *SUC2*

S. cerevisiae, *IMH3 O. polymorpha* та *BSD*, відповідно. Сірим відрізком позначено послідовності NTS

3.11. Отримання трансформантів дріжджів *P. pastoris* з посиленою експресією гена *rosC* та їх аналіз

Плазміди prosC/SUC2, prosC/IMH3, prosC/BSD були лінеаризовані рестриктазою AscI в межах NTS та трансформовані в штамі #9 *P. pastoris*. Трансформанти вдалось селекціонувати лише на середовищі з додаванням бластицидину у концентрації 500 мг/л. Наявність касети експресії гена *rosC* в геномі рецинієнтних штамах підтверджували за допомогою ПЛР з використанням пари праймерів Ko1037 GCG AAC ACC TTT CCC AAT TTT G / Ko1093 CTA ACT CTC AAA CCA TGT TCA GC. Отриманий ПЛР-фрагмент відповідав очікуваній величині ПЛР-продукту, що становить 403 п.н. (Рис. 3.24).

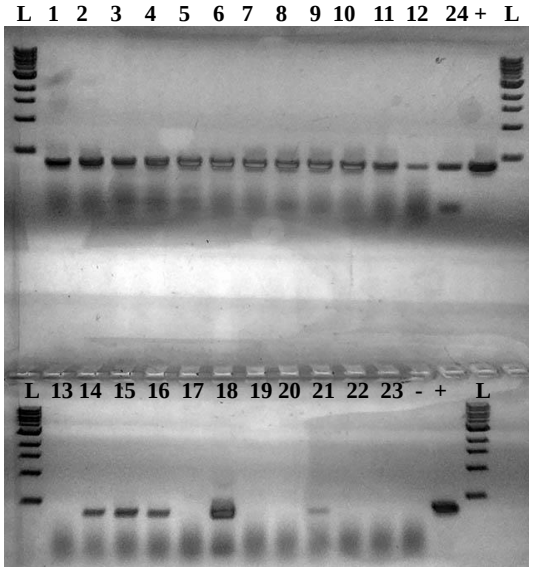


Рис. 3.24. Електрофореграма ПЛР аналізу трансформантів штаму #9 дріжджів *P. pastoris*, що містять інтегровану в геном плазміду prosC/BSD з використанням праймерів Ko1037, Ko1093. Трансформанти 1-12, 14-16, 18 містять касету експресії гена *rosC*. – негативний контроль, + позитивний контроль (в ПЛР було використано плазміду prosC/BSD як матрицю). L – маркер молекулярної ваги.

Трансформант #6 було використано для подальшого аналізу.

На основі хроматографічного аналізу культуральної рідини штаму #6 з використанням системи HPLC-DAD (Рис. 3.25.А) було виявлено домінуючий пік

з часом виходу 5,03 хв. Аналогічний пік (часом виходу 5,03 хв) отриманий для стандарту РоФ (Рис 3.25.Б)

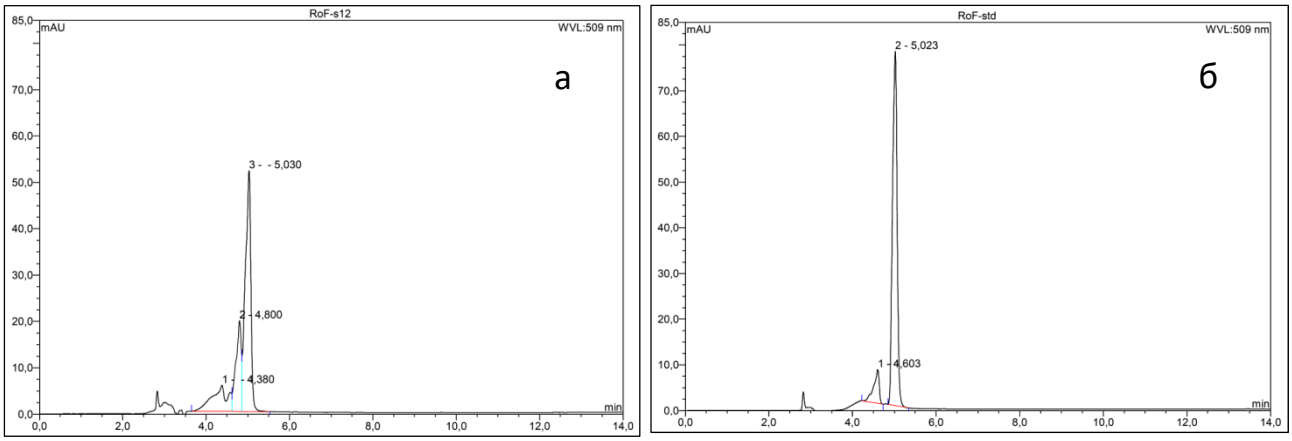


Рис. 3.25. Ідентифікація РоФ за допомогою HPLC; **а)** хроматограма поділу зразка культуральної рідини трансформанта #6 *P. pastoris*; **б)** стандарт РоФ.

Окрім того, ультрафіолетовий спектр, для цього піку (Рис. 3.26), демонстрував таку ж форму (з максимумами при 258 та 503 нм), описано в літературі [Jankowitsch et al. 2011] для РоФ.

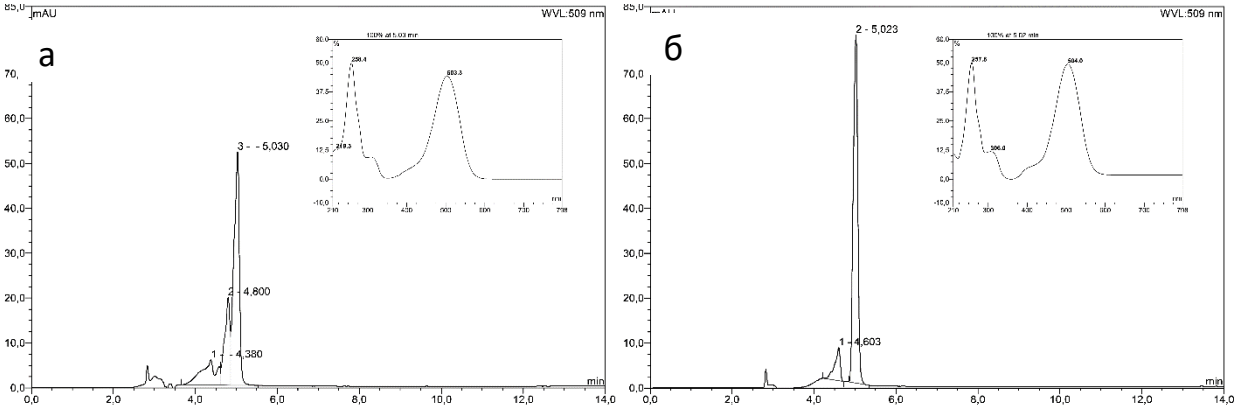


Рис. 3.26. Ультрафіолетовий спектр, для піку РоФ отриманого після HPLC

На рисунку 3.27 зображено результати мас-аналізу та фрагментації РоФ, синтезованого в клітинах штаму-продуцента РоФ *P. pastoris;*

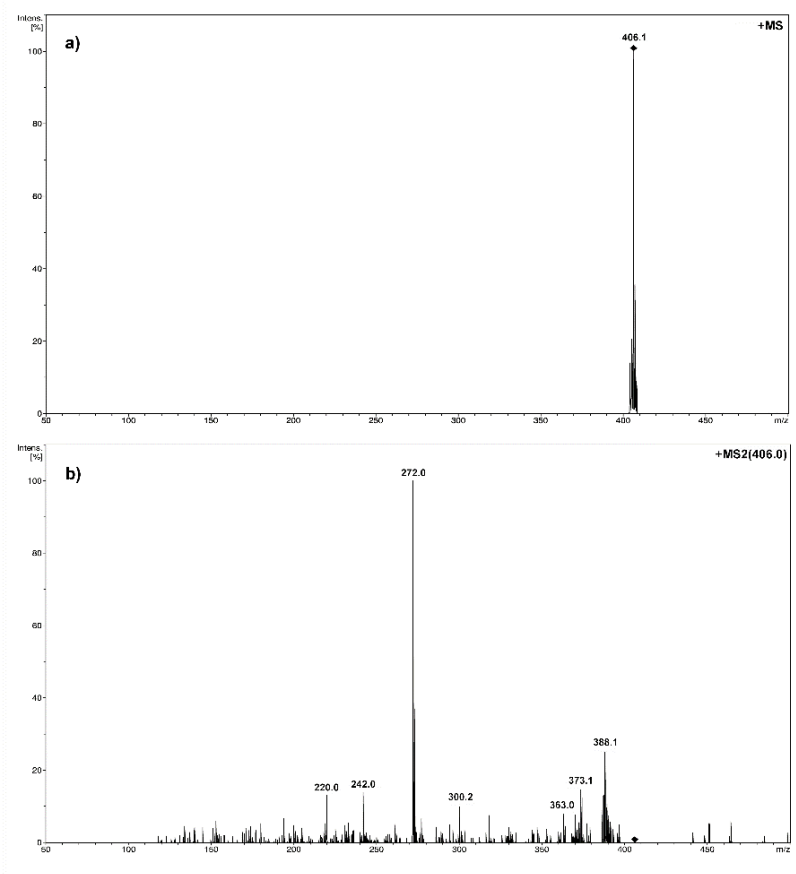


Рис. 3.27. Результати мас-аналізу та фрагментації РоФ, синтезованого рекомбінантним штамом #6 *P. pastoris* що містить надекспресовані гени *FMN1*, *rosA*, *rosB*, *rosC*; **a)** позитивна іонізація [M + H] молекулярного іона РоФ, **b)** MS/MS, фрагментація РоФ в позитивному режимі.

У результаті проведених HPLC та мас-спектрометрії показано, що рожевий флавін із культуральної рідини сконструйованого нами рекомбінантного штаму, що містить надекспресовані гени *FMN1*, *rosA*, *rosB*, та *rosC* є РоФ. За результатами HPLC встановлено, що сконструйований штам #6 *P. pastoris* синтезує близько 3 мг/л РоФ перевищуючи синтез вихідного штаму Pp#9 в півтора рази.

3.12. Розробка схеми розділення флавінів та очищення АФ з культуральної рідини штаму - продуцента АФ *C. famata*

Використання висхідної хроматографії на папері виявило, що в культуральній рідині рекомбінантного штаму *C. famata*, що містить надекспресований ген *rosB* міститься декілька форм флавінів, які відрізняються за флуоресценцією і хроматографічною рухливістю. Для ідентифікації цих сполук та отримання АФ у препаративних кількостях необхідно було опрацювати просту і ефективну схему очищення. Спроби розділити флавіни культуральної рідині за допомогою лише одного етапу – хроматографії на колонці з целюлозою були неуспішними (Рис. 3.28). Для розділення флавінів 10 мл культуральної рідини було сконцентровано за допомогою висушування при 30°С на шейкері до 200мкл. Цей препарат було нанесено на колонку розміром 20,0×1,4 см. Швидкість елюції становила 20 мл/год. Тому ми використали декілька етапів очистки АФ.

Рис. 3.28. Одноетапне розділення флавінів культуральної рідини штаму-продуцента АФ на колонці з целюлозою

Розділення флавінів культуральної рідини штаму – продуцента АФ *C. famata* на сорбенті Florisil. Florisil - це полярний високоселективний силікат магнію с приблизною формулою MgO/SiO2 (15/85), який використовується для розділення низки сполук, зокрема стероїдів, алкалоїдів, антибіотиків та інших сполук. Колонку, заповнену Florisil, промивали великою кількістю води. Далі на

колонку наносили 240 мл культуральної рідини зі швидкістю 100 мл/год. Незв'язані сполуки елюювали з колонки водою. Зв'язані з носієм гетероциклічні сполуки елюювали за допомогою градієнтної елюції 50 мл зростаючої концентрації розчину ацетону у воді (вода: 50% ацетон - 1:1). Збирали фракції об'ємом 3 мл і аналізували їх за допомогою ХГ на папері. Хроматограми аналізували за допомогою УФ лампи λ_{320} нм (Рис. 3.29). Як видно із рисунка при низьких значеннях концентрації ацетону з Florisil елюювалась невідома сполука з синьою флуоресценцією.

Рис 3.29. ХГ на папері різних фракцій флавінів, отриманих після елюції з носія Florisil.

Було проведено спектральний аналіз цієї сполуки (Рис. 3.30). Із рисунка видно що максимуми поглинання цього флавіну є при λ331 і λ356 нм.

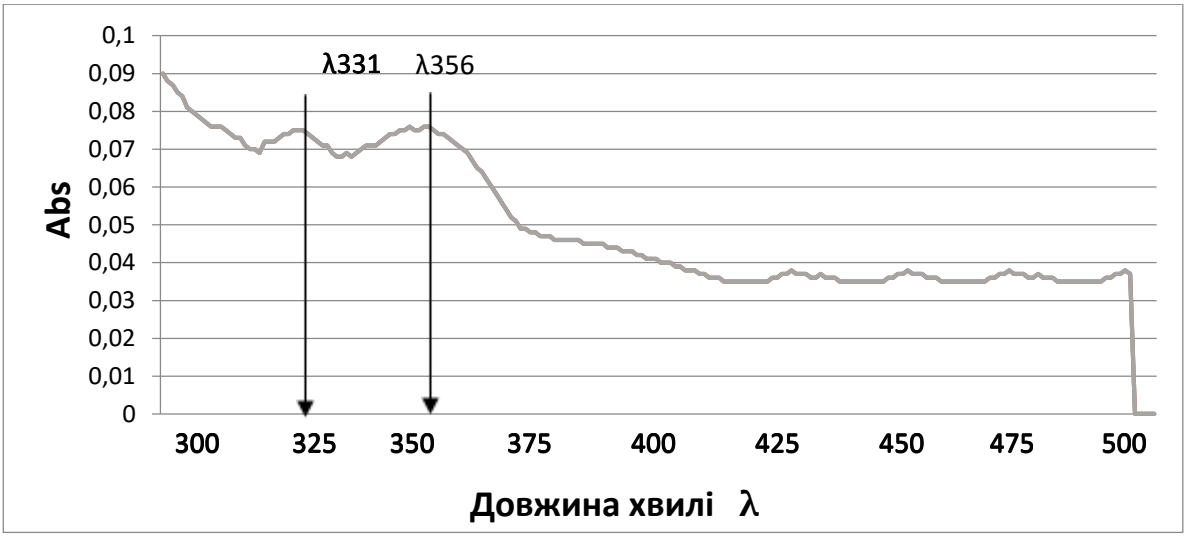


Рис. 3.30. Спектри поглинання фракцій флавінів із синьою флюоресценцією, отриманих після градієнтної елюції з Florisil.

Окрім того, з Рис. 3.29 видно, що при градієнтній елюції ацетоном з Florisil не досягається очистки сполуки з Rf=0,10 від деяких інших флавінів, хоч кількість їх є значно меншою, ніж в нативній культуральній рідині.

Зібрані після ХГ на Florisil фракції, які містили флуоресціюючу сполуку з Rf=0,10 об'єднували і концентрували до 3-4 мл за допомогою випаровування при 30°С на шейкері (200 об/хв). Отриманий препарат аналізували за допомого ХГ на папері (Рис. 3.31).

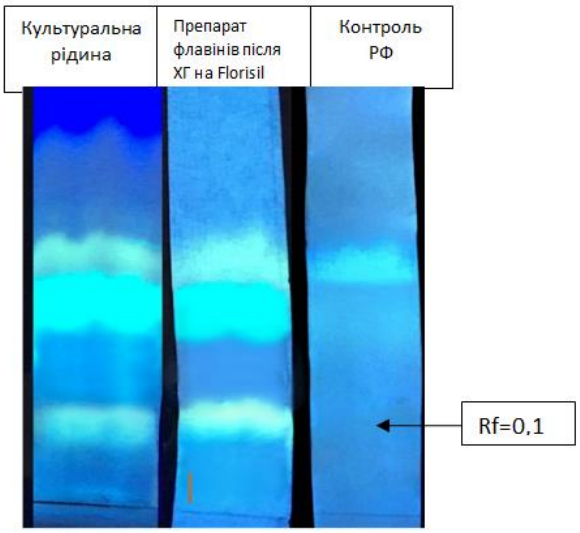


Рис. 3.31. ХГ на папері культуральної рідини та препарату флавінів, отриманого після очистки на Florisil.

Очистка препарату АРФ за допомогою ХГ на целюлозі. Колонку (50,0 × 2,4 см) заповнювали 120 мл целюлози (Roth) і промивали великою кількістю води (300 мл). Далі на колонку наносили 3-4 мл сконцентрованого препарату флавінів. Елюцію флавінів проводили водою. Швидкість протоку становила 30 мл/год. Розділення флавінів спостерігали на колонці аналізуючи їх флуоресценції в УФ. ХГ на целюлозі препарату флавінів, отриманого після ХГ на Florisil, наведено на рис. 3.32. На виході з колонки збирали фракції об'ємом 3 мл та проводили спектральний аналіз отриманих фракцій на спектрофотометрі (LANGE DR6000).

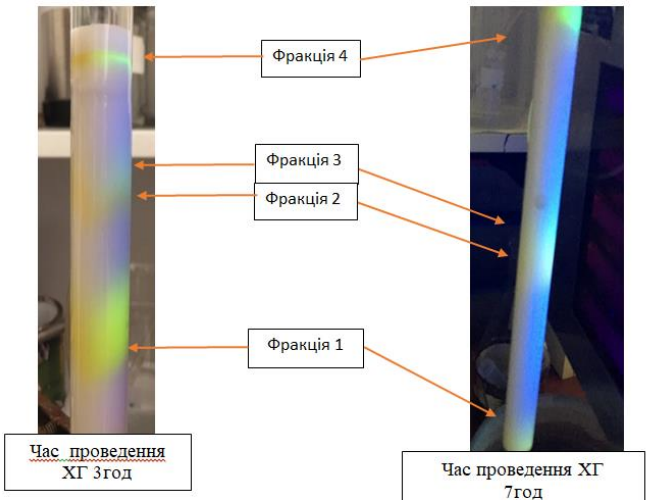


Рис. 3.32. ХГ на целюлозі препарату флавінів, після очистки культуральної рідини на носії Florisil.

На Рис. 3.33 представлено спектри поглинання фракцій флавінів, отриманих після ХГ на колонці з целюлозою.

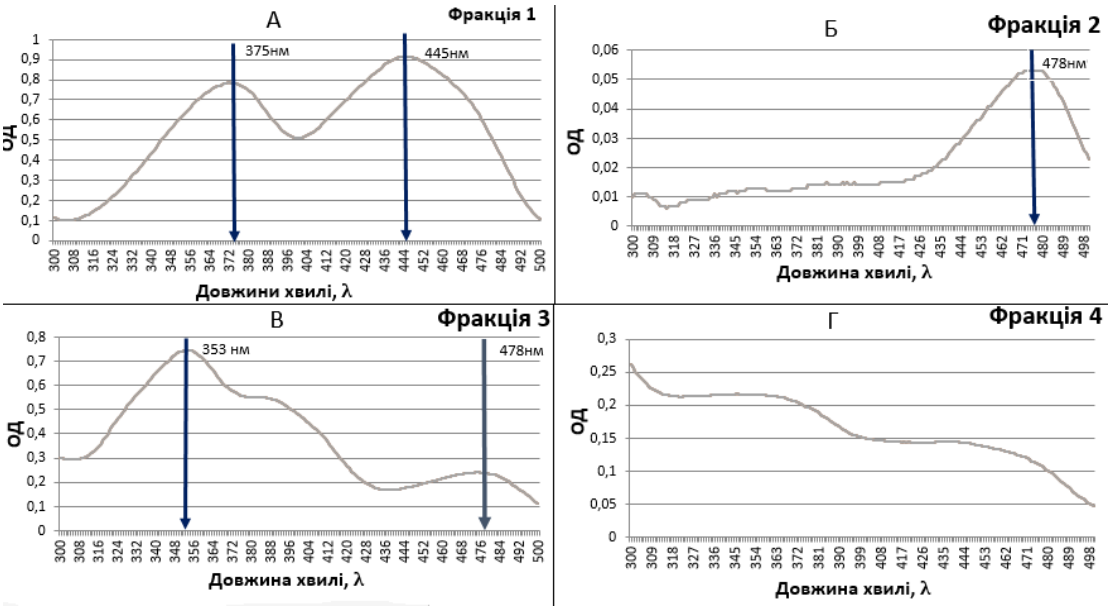


Рис. 3.33. Спектри поглинання флуоресціюючих речовин фракцій після ХГ препарату флавінів на колонці з целюлозою

Із рис. 3.33.А видно, що пікові точки поглинання флуоресціюючої речовини фракції 1 є при 375 і 445 нм, що відповідає максимумам поглинання РФ. Спектр поглинання сполуки, що містилася у фракції 2, має максимум при 478 нм (рис. 3.33.Б. Із літератури відомо [Schwarz et al., 2016], що такий максимум поглинання у воді характерний для АФ. На рис. 3.33.В та Г показано спектри поглинання

флуоресціюючих сполук із фракцій 3 і 4. На рис. 3.34 представлені хроматограми флавінів з культуральної рідини штаму *C. famata* з надекспресованим геном *rosB*.

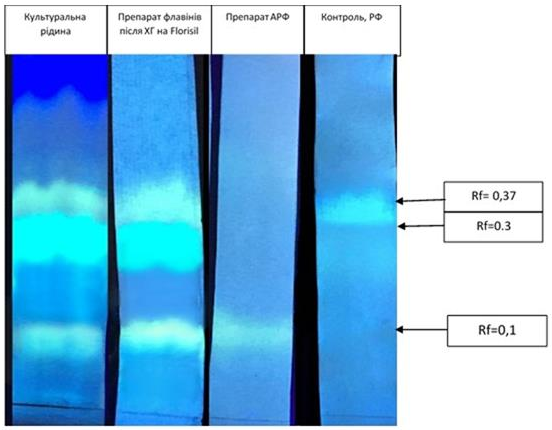


Рис. 3.34. ХГ на папері препаратів, отриманих на різних етапах очистки суміші флавінів на різних етапах очистки.

Для концентрування отриманого АФ ми випарували його на шейкері при 30°С (200 об/хв). Щоб перевірити чи не відбувається деградація АФ за цих умов, ми дослідили спектр поглинання АФ до і після випаровування (Рис. 3.36). Із рисунків видно, що при зазначених умовах випаровування зміни спектру поглинання АФ не відбувається.

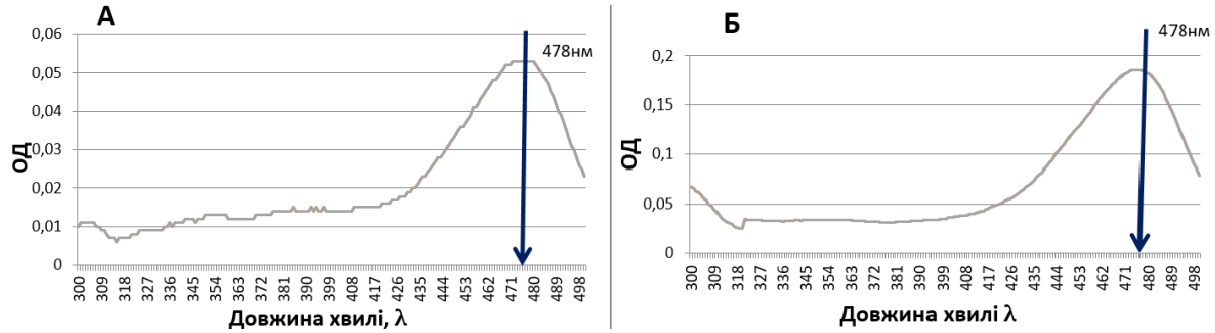


Рис. 3.36. Спектри поглинання АРФ (А-до концентрування; Б- після концентрування).

Досліджено рухливість (Rf) отриманого АФ та інших флавінів культуральної рідини дріжджів *C. famata* за допомогою ТШХ, проведеної у різних системах розчинників. На пластинки Silica gel 60 висотою 10 см та шириною 3 см наносили по 3-6 мкл флавінів: АФ, РФ, ФМН і культуральну

рідину. Для проведення ХГ використовували системи розчинників: n-бутанол-оцтова кислота-вода (20:1:4 об / об); 5% Na_2HPO_4 $12H_2O$; ацетон-вода (15:1, об. / об.) (Рис. 3.37).

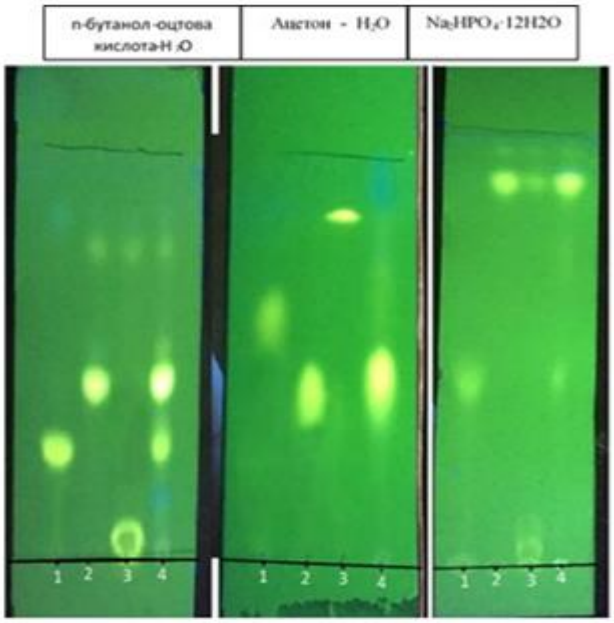


Рис. 3.37. Тонкошарова ХГ флавінів (1 - АФ, 2 - РФ, 3 - ФМН 4 – культуральна рідина штаму-продуцента) у різних системах розчинників.

Розраховані значення Rf для аналізованих флавінів наведено в таблиці 3.1. Отримані нами значення Rf для АРФ та інших флавінів узгоджуються з раніше опублікованими даними [Schwarz J. et. al. 2016].

Табл 3.3.

Значення Rf деяких флавінів в системах різних розчинників.

	АФ	**РФ**	**ФМН**
Ацетон-H_2O			
n-бутанол-оцтова кислота-H_2O			
N	0,59	0,4	0,82

Таким чином, нами розроблена схема виділення та очищення сполуки, що нагромаджується в культуральній рідині штаму *C. famata* з надекспресованим

геном *rosB,* яка за спектром поглинання світла та хроматографічною рухливістю у різних системах розчинників відповідає АФ.

3.13. Розробка схеми розділення флавінів та очищення РоФ з культуральної рідини штаму *P. pastoris* що містить надекспресовані гени *FMN1, rosA, rosB, rosC*

Оскільки в культуральній рідині трансформантів *P. pastoris,* що містять надекспресовані гени *FMN1, rosA, rosB* і *rosC*, крім рожевої, виявлено багато інших флуоресціюючих сполук, для детальної характеристики ймовірного РоФ необхідно було опрацювати способи її виділення та очищення. Для досягнення цієї мети використано декілька підходів.

Перший підхід полягав у розділенні флавінів культуральної рідини трансформантів P. pastoris, що містять надекспресовані гени *FMN1, rosA, rosB* і *rosC,* на носії Florisil. Колонку (5,0 × 1,0 см), заповнену Florisil, промивали дистильованою водою об'ємом 300 мл. Далі на колонку наносили 240 мл культуральної рідини зі швидкістю протоку 100 мл/год. Незв'язані сполуки елюювали з колонки дистильованою водою (300 мл). Зв'язані з носієм гетероциклічні сполуки вимивали за допомогою градієнтної елюції розчином (25 мл) зі зростаючою концентрацією ацетону у воді (вода : 50% ацетон - 1:1). Збирали фракції об'ємом 3 мл (Рис. 3.38).

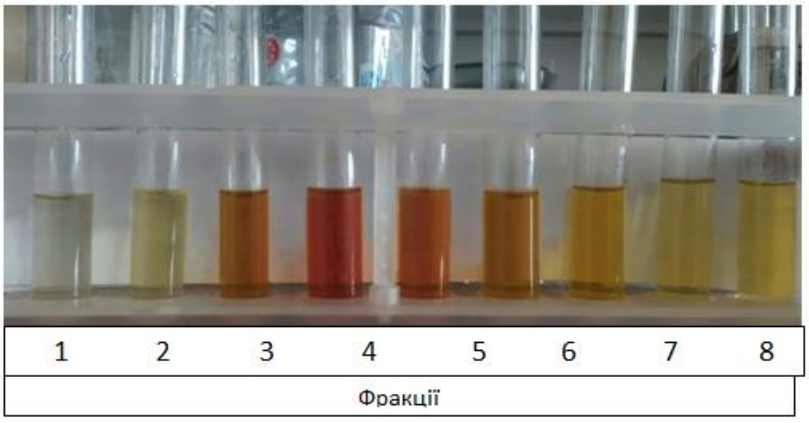


Рис. 3.38. Фото водних фракцій флавінів, отриманих після елюції з сорбента Florisil.

Була проведена також тонкошарова ХГ отриманих фракцій (Рис. 3.39). Флавін рожевого кольору (РоФ) на цьому етапі лише частково вдалось очистити від інших флавінів. Визначено Rf рожевого флавіну (Rf = 0,47).

Зібрані після ХГ на Florisil фракції, які містили рожеву сполуку з Rf=0,47 об'єднували і концентрували до 3-4 мл за допомогою випаровування при 30°С на шейкері (200 об/хв).

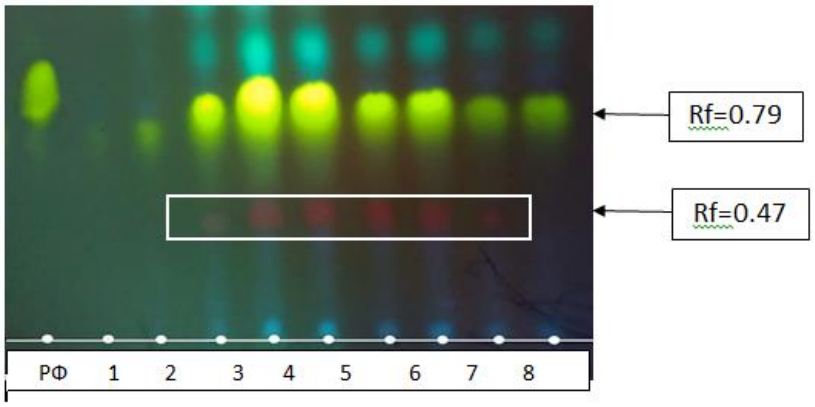


Рис. 3.39. Тонкошарова ХГ аліквот фракцій, отриманих після елюції з носія Florisil.

Другий підхід полягав в очистці препарату рожевого флавіну за допомогою ХГ на целюлозі. Колонку (50,0 × 2,4 см) заповнювали 120 мл целюлози (Roth) і промивали великою кількістю води (300 мл). Далі на колонку наносили 3-4 мл сконцентрованого препарату, що містив сполуку рожевого кольору. Елюцію флавінів з колонки проводили водою. Швидкість протоку становила 30 мл/год. Розділення флавінів на колонці спостерігали візуально (щодо рожевого флавіну) та за допомогою аналізу флуоресценції інших флавінів в УФ (Рис. 3.40). Як видно із рисунку, після проведення ХГ протягом 4 год флавіни розділяються на 4 основні фракції .

На виході з колонки збирали фракції об'ємом по 3 мл. Фракції аналізували за допомогою тонкошарової ХГ та проводили їх спектральний аналіз на спектрофотометрі (LANGE DR6000). На Рис. 3.41 представлено тонкошарову ХГ препаратів флавінів із різних фракцій. Із рисунка видно що у фракції 2 переважають флавіни з рухливістю, описаною для РФ (Rf= 0,79), а у фракції №4

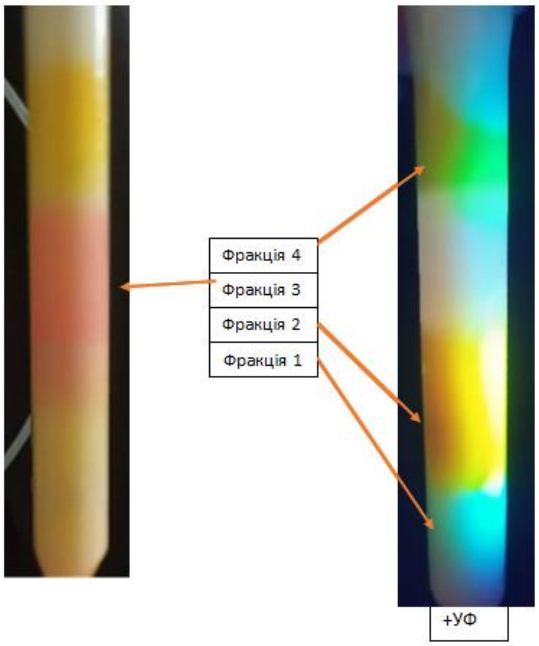


Рис. 3.40. Розділення препарату флавінів на колонці з целюлозою. Час проведення ХГ становив 4 год.

- з рухливістю характерною для АФ (Rf= 0,59). У фракції №3 в основному міститься рожевий флавін з рухливістю характерною для РоФ (Rf= 0,47).

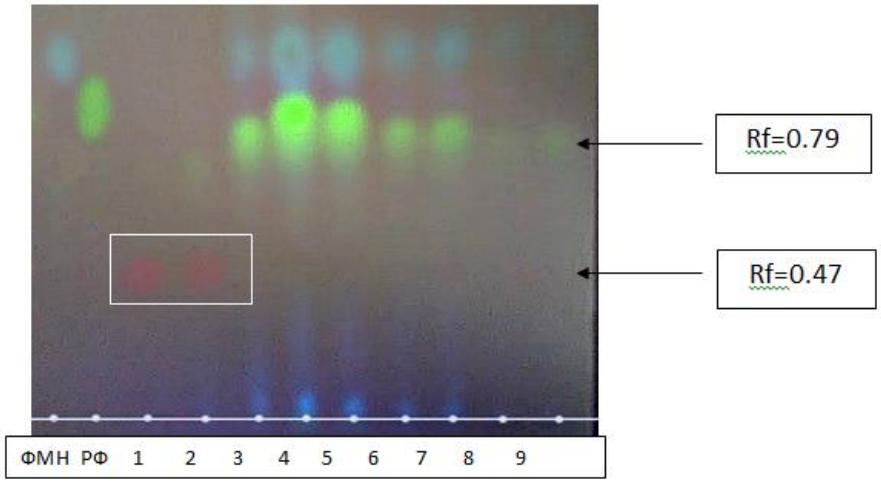


Рис. 3.41. Тонкошарова ХГ фракцій флавонів, отриманих після елюції з целюлози.

На Рис. 3.42 представлено спектри поглинання основних фракцій флавінів, отриманих після ХГ на колонці з целюлозою. Найбільшу рухливість при ХГ на целюлозі мали флавіни з спектром поглинання 404 нм (Рис. 3.42.А). Наступними за рухливістю при ХГ на целюлозі були флавіни, що мали максимум поглинання при 375 і 445 нм (рис. 3.42.Б). Згідно даних літератури це відповідає максимумам поглинання РФ. Із рис.3.42.В видно, що третя за рухливістю фракція містить

рожеву сполуку з максимумом при 505 нм. Із літератури відомо, що такий максимум поглинання світла характерний для РоФ. Найменшу рухливість мали флавіни з максимумом поглинання при 478 нм. Згідно даних літератури, такий максимум поглинання характерний для АФ.

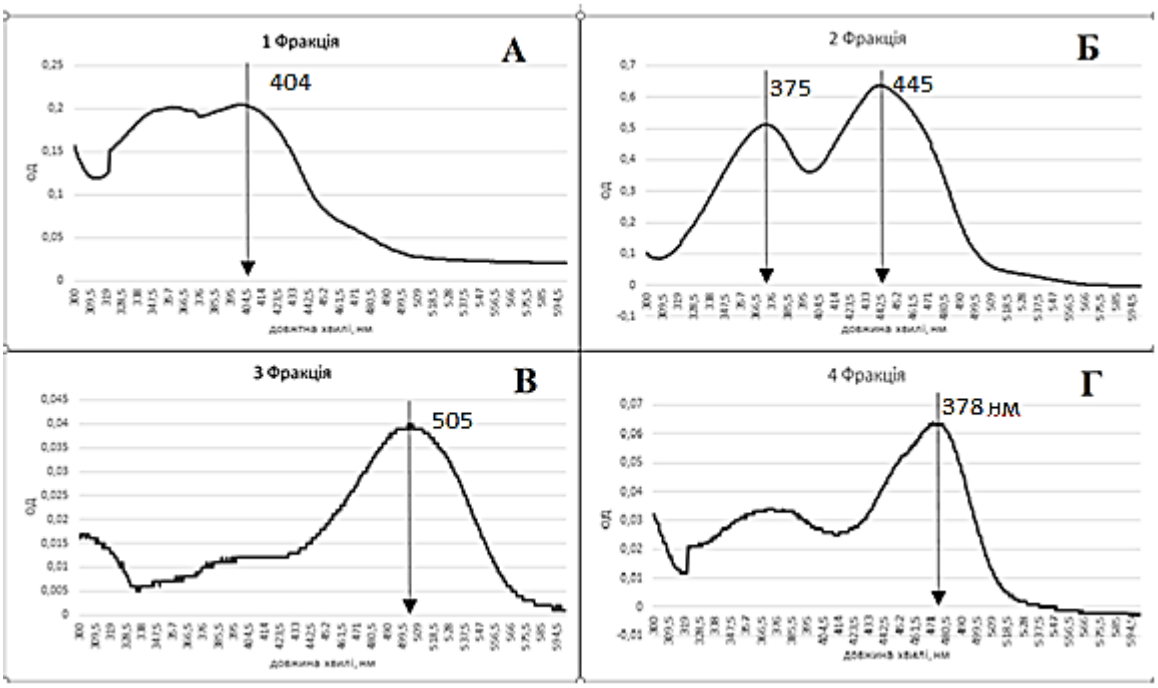


Рис. 3.42. Спектри поглинання окремих фракцій флавінів після ХГ препарату флавінів на целюлозі.

Фракції, які містили флавін з максимумом поглинання при 505 нм об'єднували. Цей препарат охарактеризовано спектрофотометрично (Рис. 3.43). Як видно із рисунка, у результаті проведеної очистки нам вдалось отримати препарат флавіну близький до гомогенності, із спектром поглинання, характерним для РоФ.

Для ідентифікації сполуки рожевого кольору, яка нагромаджується в культуральній рідині трансформантів *P. pastoris*, що містять надекспресовані гени *FMN1*, *rosA, rosB* і *rosC* було використано високоефективну рідинну хроматографію (ВЕРХ) і масс-спектрометрії.

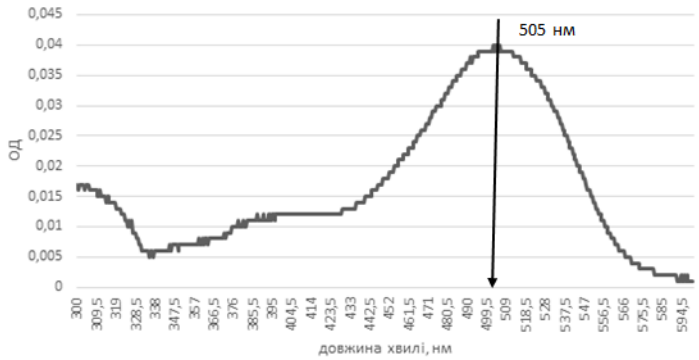
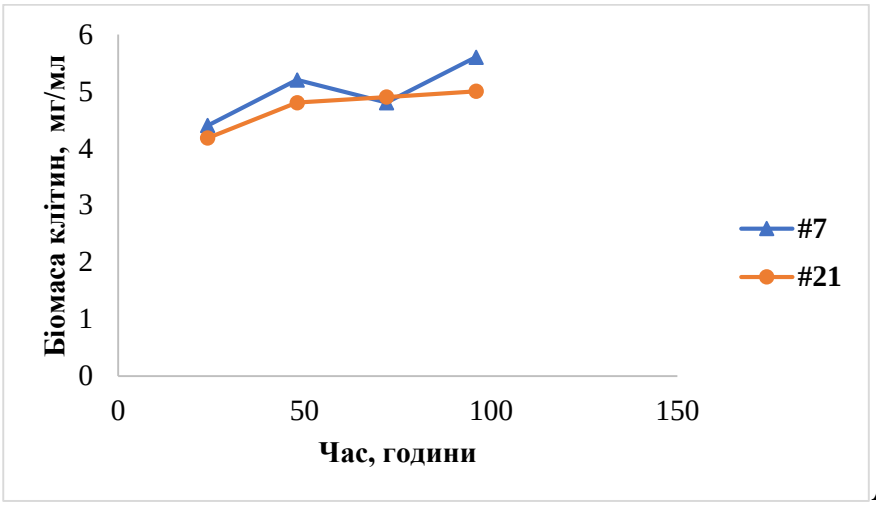


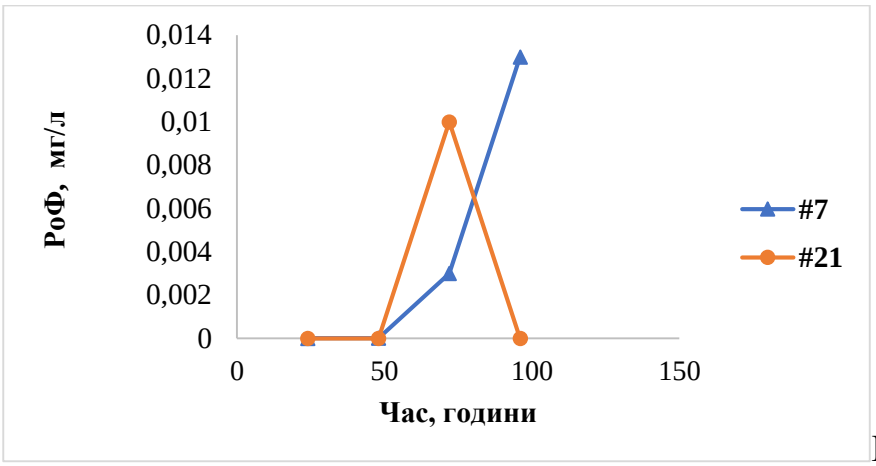
Рис. 3.43. Спектр поглинання флавіну рожевого кольору після очистки на Florisil та целюлозі.

3.13. Дослідження продукції РоФ штамами трансформантами дріжджів *C. famata FMN1/rosA/rosB/rosC*

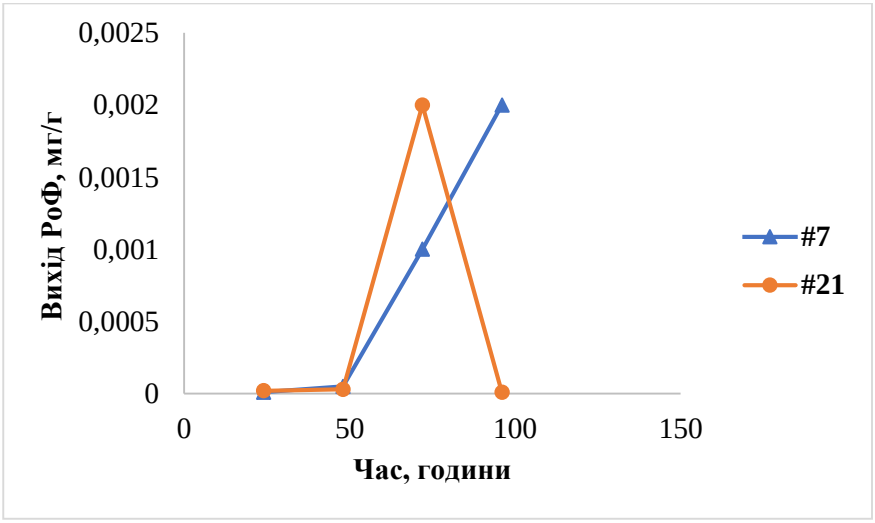
Повторні детальніші дослідження вмісту культуральних рідин трансформантів дріжджів *C. famata*, що містили гени синтезу РоФ *FMN1, rosA*, *rosB* та *rosC* за допомого HPLC показали за певних умов інкубації клітин наявність невеликих кількостей РоФ. У цих експериментах дріжджі вирощували на багатому YPD середовищі 48 годин, після чого двічі відмиті від середовища клітини переносили на YNB з 0,2% дріжджовим екстрактом. Початкова густина клітин при OD 600 нм становила 5. Інкубацію клітин проводили 96 годин на качалці (220 об/хв.) при 30 °C. Досліджено кінетику підросту та синтезу цільового флавіну трансформантами #7 і #21 (Рис. 3.44). За досліджуваний період часу спостерігалось незначне (10-20%) збільшення біомаси клітин. Невеликі кількості РоФ (0,01-0,015 мг/л) у культуральній рідині досліджуваних штамів було зафіксовано через 3-4 доби інкубації. У наступні години інкубації рівень цільового продукту зменшувався. Оскільки за певних умов інкубації деяких трансформантів дріжджів *C. famata FMN1/rosA/rosB/rosC* (#7, #21) в інкубаційному середовищі було виявлено невеликі кількості РоФ, ми поставили завдання детально дослідити у цих штамів активність ключового ферменту синтезу РоФ N,N-8-деметил-8-аміно-D-рибофлавін диметилтрансферази (RosA). Активність досліджували у недіалізованих та у діалізованих безклітинних екстрактах. Діаліз зразків проводили у діалізних мішечках 4 години проти 20 мМ Tріс-HCl буферу, pH 8,0 (100 кратні об’єми змінювали двічі).



А)



Б)



В)

Рис. 3.44. Кінетика росту (А), синтезу (Б) та вихід РоФ (В) клітин трансформантів дріжджів *C. famata FMN1/rosA/rosB/rosC* (штами: #7, #21), інкубованих у середовищі YNB.

Ферментативну реакцію проводили в 1 мл реакційної суміші, що містила 2 мМ SAM і 2 мМ АФ та різні кількості білка безклітинного екстракту. Суміш було преінкубовано 5 хв при 37°С. Реакцію розпочинали додаванням SAM. Інкубація тривала 90 хв. Кількість синтезованого продукту реакції РоФ визначали за допомогою HPLC. Отримані дані представлено у таблиці 3.4. Збільшення вдвічі кількості доданого до реакційної суміші білка з 0,25 мг до 0,5 мг приводило до зростання питомої активності більше, ніж у 10 разів. Питома активність RosA ферменту у діалізованих та недіалізованих безклітинних екстрактах суттєво не відрізнялась. В обидвох досліджуваних трансформантів #7, #21 абсолютні значення питомої RosA активності майже не відрізнялись і становили 0,7-0,8 Е $\times 10^{-5}$/мг білка.

Табл 3.4.

Питома активність RosA у трансформантів дріжджів *C. famata FMN1/rosA/rosB/rosC*

Штам *C. famata*	**Кількість доданого білка, мг**	**Питома активність RosA, Е×10^{-5}/мг білка**	
		Безклітинний екстракт	
		Недіалізований	**Діалізований**
#7	0,25	0,05	0,04
	0,5	0,8	0,7
#21	0,25	0,06	0,04
	0,5	0,7	0,6

3.15. Дослідження кінетику росту, синтезу та продуктивності РоФ у трансформантів дріжджів *P. pastoris FMN1/rosA/rosB/rosC* на різних джерелах вуглецю за різних умов інкубації

Для дослідження кінетики росту, синтезу та продуктивності розеофлавіну трансформантів дріжджів *P. pastoris FMN1/rosA/rosB/rosC* як джерело вуглецю

використовували глюкозу, фруктозу, гліцерин, етанол та метанол (Рис. 3.45). Вирощування проводили у 300 мл колбах, які містили 50 мл культуральної рідини при 220 об/хв 4 доби. На завершення досліджуваного періоду часу найбільшу біомасу дріжджових клітин спостерігали при рості на фруктозі та гліцерині. Концентрацію РоФ у культуральному середовищі вимірювали за допомогою HPLC. Найбільша кількість цільового продукту на 2-3 доби вирощування (3,0-3,5 мг/л) спостерігалась у зразках, де джерелом вуглецю були глюкоза та фруктоза. За цих умов культивування найвища продуктивність синтезу РоФ була після 24-48 годин вирощування (1,5-1,6 мг/г клітин). Тоді як при культивуванні трансформантів на гліцерині, етанолі та метанолі продукція цільового антибіотика була в 4-5 раз нижчою.

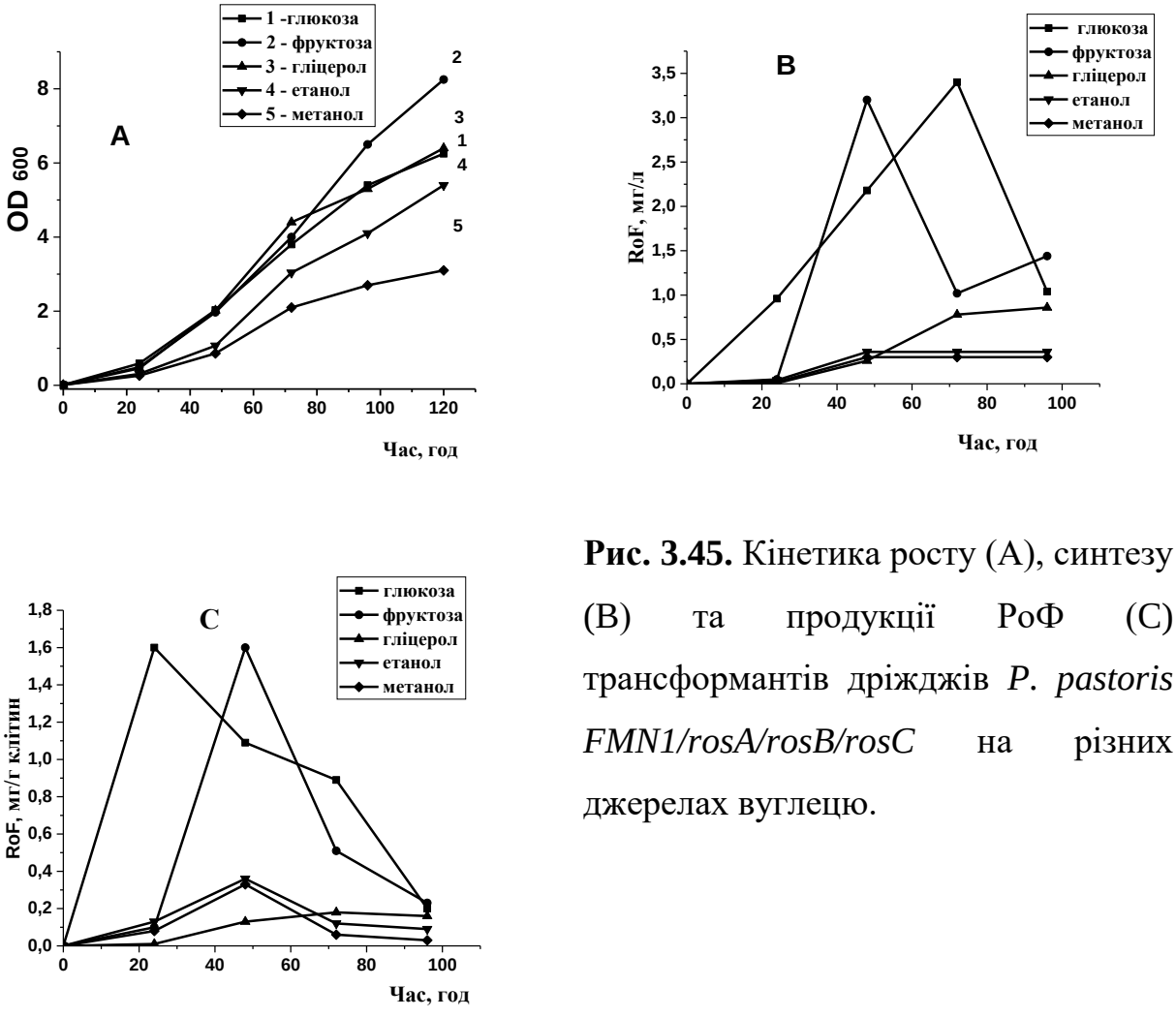
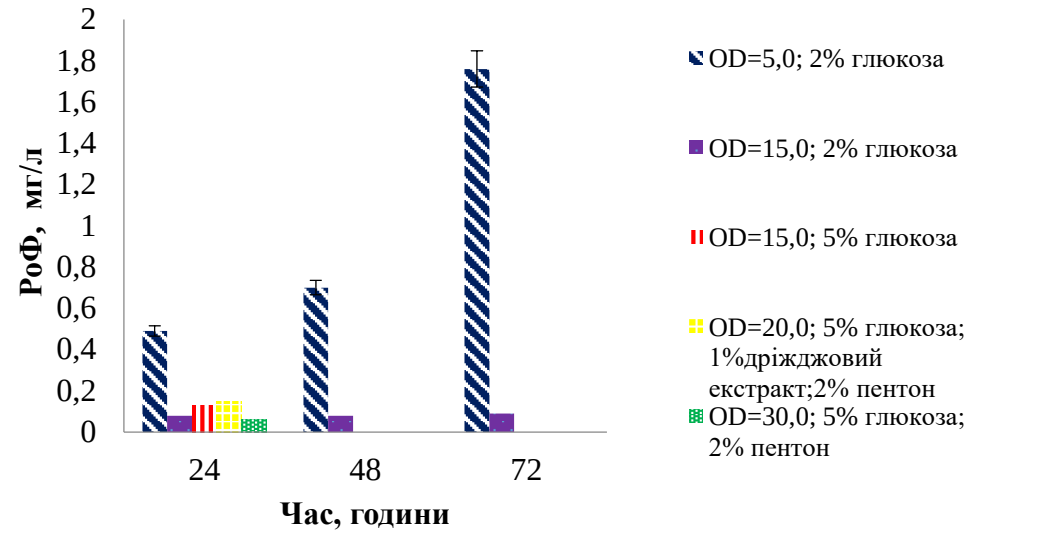


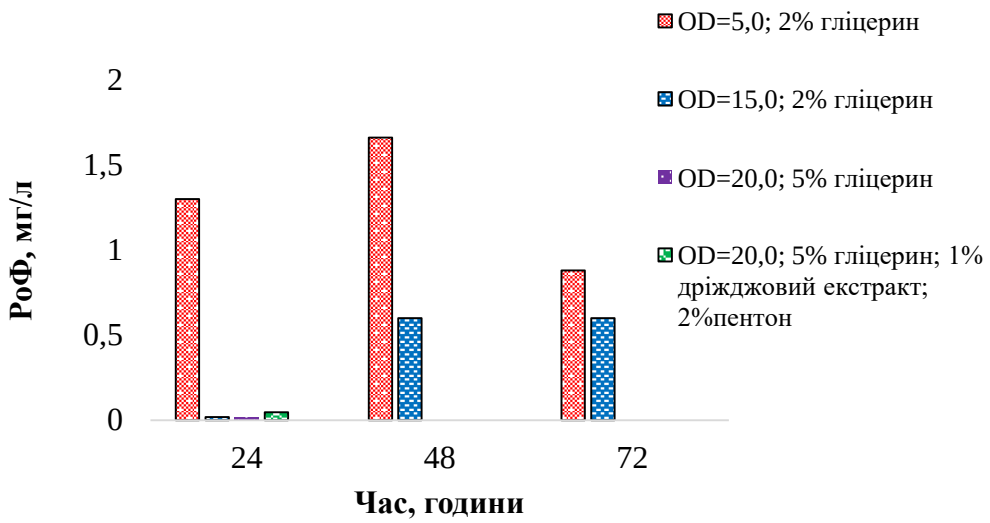
Рис. 3.45. Кінетика росту (А), синтезу (В) та продукції РоФ (С) трансформантів дріжджів *P. pastoris FMN1/rosA/rosB/rosC* на різних джерелах вуглецю.

Для збільшення продукції РоФ трансформантами дріжджів *P. pastoris FMN1/rosA/rosB/rosC* було підібрано умови їх інкубації. Інкубацію клітин проводили при 220 об/хв за 30 °С у 300 мл колбах, що містили 50 мл YNB середовища. Біомасу клітин попередньо нарощували 48 годин у YPD середовищі (50 мл у 300 мл колбах). На продукцію РоФ дріжджовими трансформантами досліджували вплив концентрації джерел вуглецю, початкової густини засіву клітин та наявність додатків (1% дріжджовий екстракт, 2% пептон) у культуральному середовищі. Вміст РоФ у культуральній рідині визначали за допомогою HPLC. На Рис. 3.46 представлено залежність продукції цільового продукту від концентрації глюкози при наявності додатків у YNB середовищі. Найбільша кількість РоФ синтезувалась при інкубації у середовищі, що містило 2% глюкозу, а початкова густина засіву клітин при OD_{600}=5. На 3 добу інкубації рівень продукту у середовищі становив 2,0 мг/л. Збільшення концентрації глюкози до 5%, а густини засіву клітин при OD_{600} до 15, 20, 30 та додавання пептону чи дріжджового екстракту приводило до зменшення вмісту РоФ у середовищі інкубації.

Досліджували також умови інкубації клітин продуцентів РоФ у YNB середовищі з гліцерином. Як видно із Рис. 3.46 найбільша кількість антибіотика у культуральному середовищі синтезувалась після 72 годин інкубації у середовищі з 2% гліцерином та початковій біомасі при OD_{600}=5,0 (1,8 мг/л). Збільшення початкової густини засіву клітин в інкубаційне середовище, підвищення концентрації гліцерину до 5% не приводило до збільшення рівня РоФ. Окрім того, проведені експерименти показали, що рівень РоФ при інкубації трансформантів у середовищі з глюкозою чи гліцерином суттєво не відрізнявся.



А)



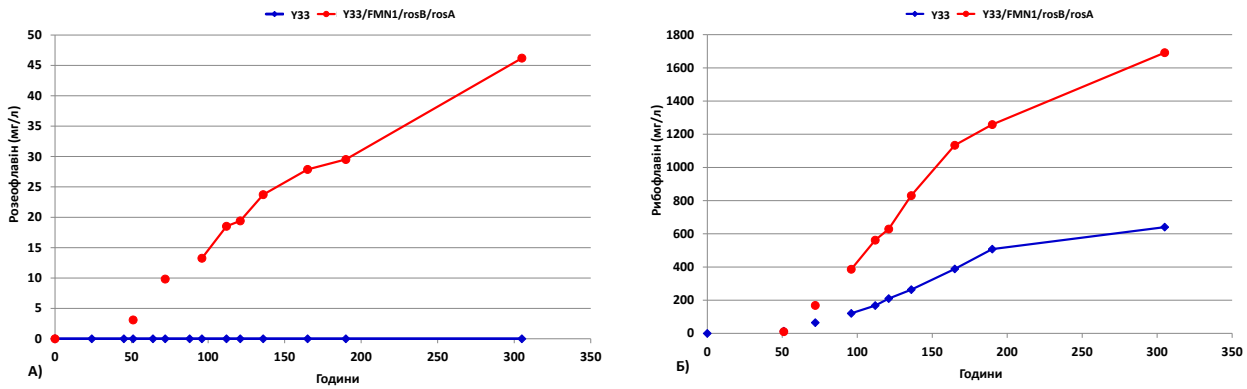
Б)

Рис. 3.46. Вміст РоФ у культуральній рідині трансформанта *P. pastoris FMN1 rosA rosB rosC* за різних умов інкубації у YNB середовищі з (А) глюкозою або (Б) гліцерином.

Для аналізу продукції РоФ при культивуванні у біореакторі було використано синтетичне середовище наступного складу із розрахунку на 1 літр: 2,0 г лимонної кислоти, 12,4 г $(NH_4)_2HPO_4$, 0,022 г $CaCl_2x2H_2O$, 0,9 г KCl, 0,5 g $MgSO_4x7H_2O$, 20 г глюкози та 4,6 мл розчину мікроелементів (на 1 літр: 6,0 г $CuSO_4x5H_2O$, 0,08 г NaI, 3,0 г. $MnSO_4xH_2O$, 0,2 г $Na_2MoO_4x2H_2O$, 0,02 г H_3BO_3 , 0,5 г $CoCl_2$, 20,0 г $ZnCl_2$, 65,0 г $FeSO_4x7H_2O$, 0,2 г біотину, і 5,0 мл H_2SO_4 (95%)). pH доводили до 5,0 з 25% HCl. Для безперервного культивування

використовували середовище наступного складу на 1 літр: 550 г глюкози, 10 г KCl, 6,45 г MgSO4, 0,35 г $CaCl_2x2H_2O$ та 12 мл розчину мікроелементів.

Предкультивування штамів проводили в середовищі YPD з 2% глюкози упродовж 36 годин при 28 ºС. Початкова густина засіву культури дріжджів у біореакторі (BioFlo 120) об'ємом 1 л становила 5 OD (λ600 нм). Об'єм середовища у біореакторі становив 400 мл. pH підтримувалося на рівні 5,0 при додаванні 12,5% гідроксиду амонію. Концентрація розчиненого кисню підтримувалася на рівні 20% шляхом контролю швидкості перемішування між 600 до 1200 об./хв при постійному протоці повітря 100 л/год. Після приблизно 50 год. культивування було розпочато режим безперервного культивування із додаванням глюкози зі швидкістю 3,6 г/год упродовж 160 годин. Максимальне накопичення біомаси для вихідного штаму було зафіксовано на 165 годину культивування, що сягало 748 OD. Штам *P. pastoris FMN1/rosB/rosA* накопичував біомасу повільніше, максимальний рівень біомаси становив 673 OD на 190 годину культивування. Максимальна продукція РоФ становила 46 мг/л на 305 години культивування. Важливо відзначити, що продукція РоФ стимулювала продукцію рибофлавіну штамом *P. pastoris FMN1/rosB/rosA*. Штам *P. pastoris FMN1/rosB/rosA* продукував 1691 мг/л рибофлавіну, перевищуючи продукцію вихідного штаму Y33 в 2,6 раза (Рис. 3.47).



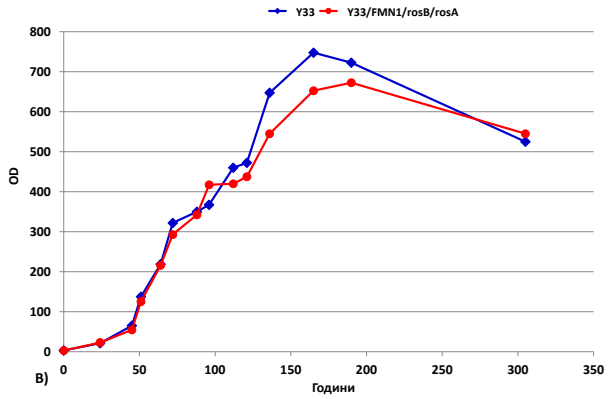


Рис. 3.47. Кінетика продукції РоФ (А), РФ (Б) та накопичення біомаси (В) при культивуванні вихідного Y33 та рекомбінантного Y33/FMN1/rosB/rosA штамів у біореакторі (BioFlo 120) об'ємом 1 л при 25 °С, pH підтримувалося на рівні 5,0 при додаванні 12,5% гідроксиду амонію. Концентрація розчиненого кисню підтримувалася на рівні 20% шляхом контролю швидкості перемішування між 600 до 1200 об./хв при постійному протоці повітря 100 л/год

Зростання продукції РФ ми пояснюємо токсичним впливом РоФ на клітини продуцента. Клітини дріжджів продукують збільшені кількості вітаміну B_2 для уникнення інтеркаляції РоФ у метаболічні шляхи де залучені флавінові коферменти.

ВИСНОВКИ

Запланована робота виконана повністю згідно технічного завдання.

Розроблено систему мультикопійної інтеграції цільових послідовностей ДНК в геном дріжджів *Candida famata*, оптимізовано CRISPR-Cas9 систему для *C. famata,* проведено дизайн генів *rosB* та *rosA S. davaonensis,* сконструйовано плазміди для мультикопійної інтеграції, що містять адаптовані гени *FMN1 C. famata*, *rosB, rosA* та *rosC S. davaonensis* під контролем сильного промотора. Отримані плазміди були використані для селекції штамів дріжджів *C. famata* з посиленою експресією відповідних генів.

Сконструйовано продуцент амінорибофлавіну на основі дріжджів *C. famata* здатний до надсинтезу ФМН шляхом посилення експресії гена *rosB.* Хроматографічний та масспектрометричний аналіз виявив амінорибофлавін, що нагромаджував рекомбінантний штам у культуральному середовищі у концентрації 5,2 мг/л. Сконструйовано штам *Pichia pastoris* з посиленою експресією генів *FMN1, rosB, rosA* та *rosC* здатний до продукції розеофлавіну у концентрації 3 мг/л.

Розроблено схему виділення та очищення амінорибофлавіну та розеофлавіну з культуральної рідини сконструйованих штамів та отримано препаративні кількості цих антибіотиків.

Підібрано умови культивування для сконструйованих штамів для максимального нагромадження цих антибіотиків. Оптимізовано умови культивування продуцента розеофлавіну у ферментері. За умов культивування у лабораторному ферментері об’ємом 1 л, рекомбінантний штам *P. pastoris* продукував 46 мг/л розеофлавіну.

ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ

Abbas C. A., Sibirny A. A. Genetic control of biosynthesis and transport of riboflavin and flavin nucleotides and construction of robust biotechnological producers. Microbiol Mol Biol Rev. 2012. P. 321-360.

Abbas C. A., Voronovsky A. Y., Fayura L. R. et al. Transformation systems for flavinogenic yeast: US. Patent No.007009045 (B2); 2006.

Bratiichuk D, Kurylenko O, Vasylyshyn R, Zuo M, Kang Y, Dmytruk K, Sibirny A. Development of new dominant selectable markers for the nonconventional yeasts *Ogataea polymorpha* and *Candida famata*. Yeast. 2020 Sep;37(9-10):505-513. doi: 10.1002/yea.3467

Chapman S, Reid G. Flavoprotein Protocols. *Methods in Molecular Biology*. *Humana Press Inc., Totowa, NJ*. 1999; 131: 247 p.

Cox MJ, Loman N, Debby Bogaert D, O'Grady J. Co-infections: potentially lethal and unexplored in COVID-19. The Lancet. 2020.

Dmytruk K. V., Abbas C. A., Voronovsky A. Y. et al. Cloning of structural genes involved in riboflavin synthesis of the yeast *Candida famata*. Ukr Biokhim Zh. 2004. P. 78-87.

Dmytruk K. V., Voronovsky A. Y., Sibirny A. A. Insertion mutagenesis of the yeast *Candida famata* (*Debaryomyces hansenii*) by random integration of linear DNA fragments. Curr Genet. 2006. P. 183-191.

Dmytruk KV, Ruchala J, Fedorovych DV et al. Modulation of the purine pathway for riboflavin production in flavinogenic recombinant strain of the yeast *Candida famata*. Biotechnology Journal. 2020; 22:e1900468.

Dmytruk KV, Sibirny AA. *Candida famata (Candida flareri)* Yeast. 2012; 29(11):453-8.

Dmytruk KV, Yatsyshyn VY, Sibirna NO, et al. Metabolic engineering and classic selection of the yeast *Candida famata (Candida flareri)* for construction of strains with enhanced riboflavin production. Metabolic Engineering. 2011; 13(1):82-8.

Fedorovych DV, Dmytruk KV, Sibirny AA. Recent Advances in Construction of the Efficient Producers of riboflavin and flavin nucleotides (FMN, FAD) in the yeast *Candida famata*. Methods Mol Biol. 2021;2280:15-30. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1286-6_2

Fitzpatrick D. A., Logue M. E., Stajich J. E. et al. A fungal phylogeny based on 42 complete genomes derived from supertree and combined gene analysis. BMC Evol Biol. 2006. 99p.

Flieger M, Bandouchova H, Cerny J, Chudíčková M, Kolarik M, Kovacova V, Martínková N, Novák P, Šebesta O, Stodůlková E, Pikula J. Vitamin B2 as a virulence factor in Pseudogymnoascus destructans skin infection. Sci Rep. 2016 Sep 13;6:33200. doi: 10.1038/srep33200.

Graham DW, Rogers EF. 7-Methyl-8-methylamino-10-(1'-D-ribityl)isoalloxazine. Patent application US4173631A, 1979.

Grill S, Busenbender S, Pfeiffer M, Köhler U, Mack M. The bifunctional flavokinase/flavin adenine dinucleotide synthetase from *Streptomyces davawensis* produces inactive flavin cofactors and is not involved in resistance to the antibiotic roseoflavin. J Bacteriol. 2008 Mar;190(5):1546-53. doi: 10.1128/JB.01586-07.

Gutierrez-Preciado A, Torres AG, Merino E, Bonomi HR, Goldbaum FA, Garcia-Angulo VA. Extensive identifcation of bacterial ribofavin transporters and their distribution across bacterial species. PLoS ONE. 2015;10:e0126124.

György P, Pearson W. The Vitamins: Chemistry, Physiology, Pathology, Methods. Academic press, New York and London. 1967; 7: 342 p.

Hemberger S, Pedrolli DB, Stolz J, Vogl C, Lehmann M, Mack M. RibM from *Streptomyces davawensis* is a ribofavin/roseofavin transporter and may be useful for the optimization of ribofavin production strains. BMC Biotechnol. 2011;11:119.

Howe JA, Wang H, Fischmann TO, Balibar CJ, Xiao L, Galgoci AM, Malin- verni JC, Mayhood T, Villafania A, Nahvi A, et al. Selective small-molecule inhibition of an RNA structural element. Nature. 2015;526:672–7.

Ishchuk OP, Dmytruk KV, Rohulya OV, et al. Development of a promoter assay system for the flavinogenic yeast *Candida famata* based on the *Kluyveromyces lactis* β-galactosidase *LAC4* reporter gene. Enzyme and Microbial Technology. 2008, 42:208–215.

Jankowitsch F, Kühm C, Kellner R, Kalinowski J, Pelzer S, Macheroux P, Mack M. A novel N,N-8-amino-8-demethyl-D-riboflavin Dimethyltransferase (RosA) catalyzing the two terminal steps of roseoflavin biosynthesis in *Streptomyces davawensis*. J Biol Chem. 2011 Nov 4;286(44):38275-38285. doi: 10.1074/jbc.M111.292300.

Jankowitsch F, Schwarz J, Ruckert C, Gust B, Szczepanowski R, Blom J, Pelzer S, Kalinowski J, Mack M. Genome sequence of the bacterium *Streptomyces davawensis* JCM 4913 and heterologous production of the unique antibiotic roseofavin. J Bacteriol. 2012;194:6818–27.

Johnston CG, Aust SD. Detection of *Phanerochaete chrysosporium* in soil by PCR and restriction enzyme analysis. Appl Environ Microbiol. 1994 Jul;60(7):2350-4. doi: 10.1128/aem.60.7.2350-2354.

Juri N, Kubo Y, Kasai S, Shohe. Formation of Roseoflavin from 8-Amino and 8-Methylamino-8 - Demethyl-D-Riboflavin. Journal of Biochemistry. 1987; 101: 705-711.

Krajewski SS, Ignatov D, Johansson J. Two are better than one: dual targeting of riboswitches by metabolite analogs. Cell Chem Biol. 2017;24:535–7.

Landwehr W, Kampfer P, Glaeser SP, Ruckert C, Kalinowski J, Blom J, Goesmann A, Mack M, Schumann P, Atasayar E, et al. Taxonomic analyses of members of the *Streptomyces cinnabarinus* cluster, description of *Streptomyces cinnabarigriseus* sp. nov. and *Streptomyces davaonensis* sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol. 2018;68:382–93.

Lee ER, Blount KF, Breaker RR. Roseofavin is a natural antibacterial com- pound that binds to FMN riboswitches and regulates gene expression. RNA Biol. 2009;6:187–94.

Lyzak O. Generation of mutations in *ADE2* gene using a CRISPR-Cas9 system in the flavinogenic yeast *Candida famata* / O. Lyzak, K. Dmytruk, A. Sibirny // Вісник Львівського університету. Серія біологічна. - 2016. 73: 154-159.

Mansjo M, Johansson J. The ribofavin analog roseofavin targets an FMNriboswitch and blocks *Listeria monocytogenes* growth, but also stimulates virulence gene-expression and infection. RNA Biol. 2011;8:674–80.

Marx H, Mattanovich D, Sauer M. Overexpression of the riboflavin biosynthetic pathway in *Pichia pastoris*. Microb Cell Fact. 2008; 7:23.

Matern A, Pedrolli D, Grosshennig S, Johansson J, Mack M. Uptake and metabolism of antibiotics roseofavin and 8-demethyl-8-aminoribofavin in ribofavin-auxotrophic *Listeria monocytogenes*. J Bacteriol. 2016;198:3233–43.

Millerioux Y, Clastre M, Simkin AJ, Courdavault V, Marais E, Sibirny AA, Noel T, Creche J, Giglioli-Guivarch N, Papon N Drug-resistant cassettes for the efficient transformation of *Candida guilliermondii* wild-type strains. FEMS Yeast Res 2011.11:457–463

Mora-Lugo R., Stegmüller J. and Macket M. Metabolic engineering of roseofavin-overproducing microorganisms Microb Cell Fact. 2019.18:146 https://doi.org/10.1186/s12934-019-1181-2.

Ng H., Dean N. Dramatic Improvement of CRISPR/Cas9 Editing in *Candida albicans* by Increased Single Guide RNA Expression. *mSphere*. 2017. DOI: 10.1128/mSphere.00385-16

Otani S, Kasai S, Matsui K. Isolation, chemical synthesis, and properties of roseofavin. Methods Enzymol. 1980;66:235–41.

Pedrolli D, Nakanishi S, Barile M, et al. The antibiotics roseoflavin and 8-demethyl-8-aminoriboflavin from *Streptomyces davawensis* are metabolized by human flavokinase and human FAD synthetase. Biochemical Pharmacology. 2011; 82:1853–1859.

Pedrolli DB, Jankowitsch F, Schwarz J, Langer S, Nakanishi S, Frei E, Mack M. Ribofavin analogs as antiinfectives: occurrence, mode of action, metabolism and resistance. Curr Pharm Des. 2013;19:2552–60.

Pedrolli DB, Jankowitsch F, Schwarz J, Langer S, Nakanishi S, Mack M. Natural ribofavin analogs. Methods Mol Biol. 2014;1146:41–63.

Pedrolli DB, Matern A, Wang J, Ester M, Siedler K, Breaker R, Mack M. A highly specialized flavin mononucleotide riboswitch responds differently to similar ligands and confers roseoflavin resistance to *Streptomyces davawensis*. Nucleic Acids Res. 2012 Sep 1;40(17):8662-73. doi: 10.1093/nar/gks616.

Pedrolli DB, Matern A, Wang J, Ester M, Siedler K, Breaker R, Mack M. A highly specialized favin mononucleotide riboswitch responds diferently to similar ligands and confers roseofavin resistance to *Streptomyces davawensis*. Nucleic Acids Res. 2012;40:8662–73

Ritchie H, Roser M. 2020; "Causes of Death". Published online at OurWorldInData.org. Retrieved from: 'https://ourworldindata.org/causes-of-death'

Schneider C, Konjik V, Kißling L, Mack M. The novel phosphatase RosC catalyzes the last unknown step of roseoflavin biosynthesis in *Streptomyces davaonensis*. Mol Microbiol. 2020 Oct;114(4):609-625. doi: 10.1111/mmi.14567.

Schwarz J, Konjik V, Jankowitsch F, Sandhoff R, Mack M. Identification of the Key Enzyme of Roseoflavin Biosynthesis. Angew Chem Int Ed Engl. 2016 May 10;55(20):6103-6. doi: 10.1002/anie.201600581.

Tanner F. W., Voinovich Jr. C., Van Lanen J. M. Riboflavin production by *Candida* species. Science. 1945. P .180-181.

Tsyrulnyk AO, Fedorovych DV, Dmytruk KV, Sibirny AA. Overexpression of riboflavin excretase enhances riboflavin production in the yeast *Candida famata*. Methods Mol Biol. 2021;2280:31-42. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1286-6_3.

Tsyrulnyk A. O., Andreieva Y. A., Ruchala J., Fayura L. R., Dmytruk K. V., Fedorovych D. V., Sibirny A. A. Expression of yeast homolog of the mammal BCRP gene coding for riboflavin efflux protein activates vitamin B_2 production in the flavinogenic yeast *Candida famata* Yeast.2020, 37, 467-473. https://doi.org/10.1002/yea.3470.

Tyagi A, Zirak P, Penzkofer A, Mathes T, Hegemann P, Mack M, Ghisla S. Absorption and emission spectroscopic characterisation of 8-amino-riboflavin. *Chemical Physics.* 2009; 364: 19 -30.

Voronovsky A., Abbas C., Fayura L., et al. Development of a transformation system for the flavinogenic yeast *Candida famata* // FEMS Yeast Res. 2002. – P. 381-388.

Wang H, Mann PA, Xiao L, Gill C, Galgoci AM, Howe JA, Villafania A, Barbieri CM, Malinverni JC, Sher X, et al. Dual-targeting small molecule inhibitors of the *Staphylococcus aureus* FMN riboswitch disrupt ribofavin homeostasis in an infectious setting. Cell Chem Biol. 2017; 24:576–588.

Weninger A., Hatzl A. M., Schmid C., Vogl T., Glieder A. Combinatorial optimization of CRISPR/Cas9 expression enables precision genome engineering in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. J Biotechnol. 2016. P. 139-149.

Yatsyshyn VY, Fedorovych DV, Sibirny AA. Metabolic and bioprocess engineering of the yeast *Candida famata* for FAD production. J Ind Microbiol Biotechnol. 2014; 41(5):823-35.

Yatsyshyn VY, Ishchuk OP, Voronovsky AY, Fedorovych DV, Sibirny AA. Production of flavin mononucleotide by metabolically engineered yeast *Candida famata*. Metab Eng. 2009; 11(3):163- 7.

Zhou F, Yu T, Du R, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. Lancet 2020 .395(10229):1054-1062. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30566-3.

Маниатис. Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. // М., Мир, 1984, 480 стр.