

РОЗРОБКА ПЛАТФОРМИ ДЛЯ КОНСТРУЮВАННЯ НАДПРОДУЦЕНТІВ АМІНОРИБОФЛАВІНУ НА ОСНОВІ ФЛАВІНОГЕННИХ ДРІЖДЖІВ *CANDIDA FAMATA*

А. Цирульник¹, К. Дмитрук¹, Д. Федорович¹, А. Сибірний^{1,2,*}

¹Відділ молекулярної генетики та біотехнології

Інститут біології клітини НАН України

вул. Драгоманова, 14/16, Львів 79005, Україна

²Відділ біотехнології та мікробіології, факультет біології та агрономії

Жешувський університет, вул. Зельверовича, 4, Жешув 35-601, Польща

e-mail: sibirny@cellbiol.lviv.ua

Антибіотик розеофлавін і його біосинтетичний попередник амінорибофлавін (АФ) продукуються грампозитивними бактеріями *Streptomyces davawensis* і *Streptomyces cinnabarinus*. Особливо цікавим є АФ, оскільки він проявляє виражену антибіотичну дію щодо грампозитивних бактерій *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* та *Micrococcus luteus* і водночас не є токсичним для культур клітин ссавців. Одержання АФ у промислових масштабах шляхом конструювання мікробних надпродуцентів цього антибіотика має велику науково-практичну цінність. Для конструювання надпродуцентів АФ як вихідні організми доцільно використовувати наявні надпродуценти флавінмононуклеотиду (ФМН) та рибофлавіну (РФ), оскільки синтез АФ у клітині відбувається із ФМН, який, у свою чергу, утворюється із РФ. Мета даної роботи полягала в досягненні гетерологічної експресії ключового гена синтезу АФ *rosB*, що кодує 8-диметил-8-амінорибофлавін-5'-фосфатсинтетазу у штаму дріжджів *Candida famata* AF-4, що є надпродуцентом РФ. Для досягнення високого рівня експресії ген *rosB* було введено в геном реципієнта у складі плазміни під контролем сильного конститутивного промотора гена *TEF1 Debaryomyces hansenii*, що кодує фактор елонгації трансляції. Отримані трансформанти штаму AF4 стабілізували, а наявність касети експресії гена *rosB* в геномі реципієнта було підтверджено за допомогою ПЛР. Використаний підхід дає змогу експресувати гени біосинтезу АФ та розеофлавіну *S. davawensis* у дріжджових надпродуцентів РФ/ФМН *C. famata* з метою конструювання надсинтетиків цих антибіотиків.

Ключові слова: амінорибофлавін, ген *rosB*, дріжджі *Candida famata*.

Конструювання надпродуцентів антибіотиків шляхом генетичної модифікації мікроорганізмів є сучасним та ефективним методом фармацевтичної промисловості. Особливий інтерес становить виробництво нових лікарських засобів, оскільки тривале використання одного типу антибіотиків зазвичай призводить до появи резистентності у патогенних штамів мікроорганізмів. Інфекції, викликані золотистим стафілококом *S. aureus*, вважаються одними з найпоширеніших типів інфекційних захворювань, що вражають відкриті рани при проведенні хірургічних операцій [1, 5]. Швидке набуття резистентності штамів цих бактерій, стійких до цілої низки антибіотиків, зокрема, так званих штамів MRSA (methicillin-resistant *S. aureus*), призводить до тяжких, а інколи і летальних наслідків перебігу захворювання [6, 7].

АФ має виражену антибіотичну дію щодо *S. aureus* та низки інших мікроорганізмів. Потрапляючи у клітину-мішень через транспортну систему рибофлавіну, він формує аналоги флавінових кофакторів, а саме амінофлавін-мононуклеотид і амінофлавін-аденін-

динуклеотид, які, зв'язуючись із цілою низкою флавінзалежних протеїнів, блокують їхні функції, викликаючи загибель клітини [8, 9]. Іншим механізмом антибіотичної дії цих сполук є зв'язування із бактерійним генетичним елементом Riboswitch, що призводить до дефіциту рибофлавіну в клітині, і як наслідок – також до її загибелі. Важливо відзначити, що транспортні системи рибофлавіну людини, на відміну від бактерійних, не здатні транспортувати АФ, що робить його перспективним лікарським засобом [8-10].

У даній роботі описано підходи до конструювання штаму дріжджів *C. famata* з гетерологічною експресією гена *rosB* *S. davawensis*, що кодує 8-диметил-8-амінорибофлавін-5'-фосфатсинтетазу з метою створення платформи для отримання дріжджових продуцентів антибіотика АФ.

Матеріали і методи

У роботі використовували штами дріжджів *C. famata* AF-4, здатні до надпродукції РФ [2], та *Debaryomyces hansenii* CBS767. Дріжджі вирощували на багатому середовищі YPD (0,5 % дріжджовий екстракт, 1 % пептон, 2 % глюкоза) або на мінеральному середовищі YNB (0,67 % YNB, 2 % глюкоза) за 30 °С. Для селекції дріжджових трансформантів *C. famata* середовище містило 20 мг/л флеоміцину.

Бактерійний штам *E. coli* DH5 α (Ф80dlacZ Δ M15, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*(r_k⁻, m_k⁺), *supE44*, *relA1*, *deoR*, Δ (*lacZYA-argF*)U169) вирощували за 37 °С на багатому середовищі LB (0,5 % дріжджовий екстракт, 1 % пептон, 1 % NaCl). Для селекції плазмід-вмісних бактерій використовували ампіцилін у концентрації 100 мг/л.

У роботі були використані стандартні молекулярно-генетичні методи [11]. Геномна ДНК дріжджів була ізольована за допомогою Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, WI, USA). Ген *rosB* *S. davawensis* з послідовністю нуклеотидів, адаптованою для експресії в *C. famata*, був синтезований фірмою BioCat GmbH (Heidelberg, Germany). Ендонуклеази рестрикції та лігазу використовували згідно з інструкцією виробника (Fermentas, Vilnius, Lithuania). Виділення плазмідної ДНК з бактерій *E. coli* проводили за допомогою Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega, Madison, WI, USA). Полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) проводилася на ампліфікаторі GeneAmp[®] PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) з використанням Platinum[®] Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) згідно з інструкцією виробника. Трансформацію дріжджів *C. famata* проводили методом електропорації [13].

Результати і їхнє обговорення

Для конструювання мікробних продуцентів АФ як вихідні організми доцільно використовувати наявні надпродуценти ФМН та РФ, оскільки синтез АФ у клітині відбувається з ФМН, який, у свою чергу, утворюється з РФ. Ген *rosB* *S. davawensis* кодує 8-диметил-8-амінорибофлавін-5'-фосфатсинтетазу, що каталізує три послідовні реакції перетворення ФМН до 8-диметил-8-форміл-рибофлавін-5-фосфату, з подальшим перетворенням до 8-диметил-8-карбоксі-рибофлавін-5-фосфату, що далі перетворюється до 8-диметил-8-амінорибофлавін-5-фосфату. 8-Диметил-8-амінорибофлавін-5-фосфат, у свою чергу, за участі неспецифічної фосфатази дефосфорилується до АФ [12].

Для досягнення гетерологічної експресії ген *rosB* було клоновано під контролем сильного конститутивного промотора і термінатора гена *TEF1* *D. hansenii*, що кодує фактор елонгації трансляції. Конструювання плазміни рTb_RosB, що містить касету експресії для гена *rosB* *S. davawensis*, було проведено у два етапи. Промотор і термінатор гена *TEF1* було ампліфіковано з геномної ДНК *D. hansenii* CBS767 за допомогою відповідних пар праймерів Ko427 (AAAAAGCTTGCTCCCCCTACCAAGCCTAC) / Ko428 (GACTTTCSSAAATAC-

GTTTAAGGAGCCTGCAGGTCGACGCGGCCGCGGATCCTTTGATTAATTAATATATA-AAATATATGTTTGTGG) та Ko429 (CCACAAACATATATTTTATATATTAATTAATCAAAG-GATCCGCGGCCGCGTTCGACCTGCAGGTCCTTAAACGTATTTGGGAAAGTC) / Ko430 (AAATCTAGAGATTATTGACTCGAGATGTTGCGCCG). Праймери Ko427 та Ko430 було використано для поєднання промотора і термінатора гена *TEF1 D. hansenii*. Отриманий фрагмент величиною 973 п.н. після обробки рестриктазами HindIII та XbaI було клоновано в HindIII/XbaI-лінеаризовану плазмиду рТb [3]. Дріжджі *C. famata* належать до організмів з особливим генетичним кодом. Триплет CUG, який у більшості дріжджів кодує лейцин, у *C. famata* кодує серин. Ген *rosB S. davawensis* було синтезовано з урахуванням особливості генетичного коду *C. famata* і клоновано у складі BamHI/PstI фрагмента у відповідні сайти попередньо сконструйованої плазмиди. Сконструйована плазмиди отримала назву рТb_RosB (рис. 1, А), коректність якої було підтверджено за допомогою рестрикційного аналізу з використанням ендонуклеаз рестрикції BglI, KpnI та HindIII (рис. 1, Б).

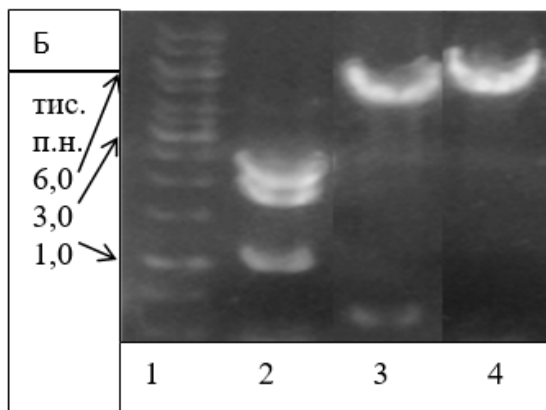
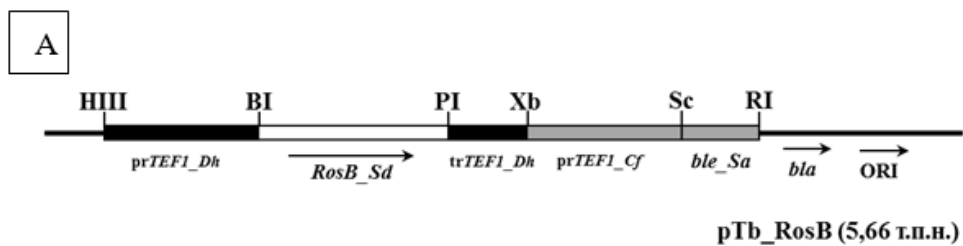


Рис. 1. А – Лінійна схема плазмиди рТb_RosB (5,66 т.п.н.). Промотор і термінатор гена *TEF1 D. hansenii* позначено чорним відрізком, а ВРТ гена *rosB S. davawensis* позначено білим відрізком. Маркерний ген *ble S. aureus* під контролем промотора гена *TEF1 C. famata* для селекції дріжджових трансформантів позначено сірим відрізком. Бактерійна точка початку реплікації та ген *ble*, що забезпечує селекцію бактерійних трансформантів на середовищі з ампіциліном, позначено стрілками. Сайти рестрикції: HIII – HindIII; BI – BamHI; PI – PstI; Xb – XbaI; Sc – SacI; RI – EcoRI. Б – Електрофореграма рестрикційного аналізу плазмиди рТb_RosB: 1 – маркер молекулярної ваги; 2 – гідроліз рестриктазою BglI (фрагменти розміром (п.н.) 1118, 2004, 2544); 3 – гідроліз рестриктазою KpnI (фрагменти розміром (п.н.) 664, 5002); 4 – гідроліз рестриктазою HindIII (лінеаризація плазмиди, розмір 5666 п.н.)

HindIII-лінеаризовану плазмину рTb_RosB трансформували у реципієнтний штам AF-4дріжджів *C. famata*. Після трансформації клітини висівали на селективне YPD середовище, що містило флеоміцин. Колонії, здатні рости на селективному середовищі, з'явилися після 3 днів інкубації з частотою ~ 50 трансформантів на 1 мкг плазмідної ДНК. Трансформанти стабілізували шляхом культивування в неселективному середовищі протягом 15-17 генерацій з подальшим перенесенням на селективне середовище з флеоміцином. Наявність гена *rosB* у геномі трансформантів була підтверджена за допомогою ПЛР, використовуючи пару праймерів RBFa (TAT TGA ACA CAA CCT TGC GTC G) / RBRa (ATC STA ACT GAG ATT CCT CAA CC) (рис. 2).

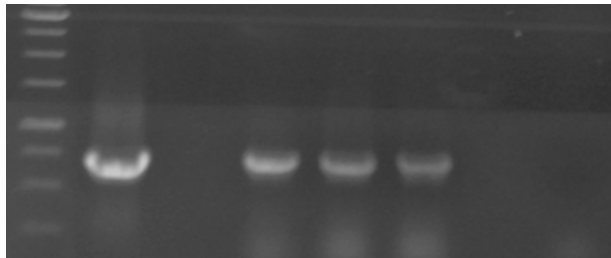


Рис. 2. Електрофореграма ПЛР-аналізу трансформантів штаму AF4 *C. famata* плазмідною рTb_RosB: 1 – 1 kb ДНК маркер, амплікований ген *RosB* із: 2 – ДНК *S. davawensis* (позитивний контроль); 3-5 – ДНК трьох незалежних трансформантів *C. famata*; 6 – ДНК штаму AF4 (негативний контроль)

У результаті проведеної роботи на основі надпродуцента РФ було сконструйовано рекомбінантні штами *C. famata* з посиленою експресією гена *rosB S. davawensis*, що каталізує перетворення ФМН до АФ. Сконструйовані штами слугуватимуть зручною платформою для отримання ефективних продуцентів антибіотиків АФ та розеофлавіну.

Подяка

Робота виконана за фінансової підтримки НАН України (проект № 36-16).

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Becker R.E., Bubeck Wardenburg J. *Staphylococcus aureus* and the skin: a longstanding and complex interaction // *Skinmed.* 2015. Vol. 13. № 2. P. 111-119.
2. Dmytruk K.V., Yatsyshyn V.Y., Sibirna N.O. 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. Vol. 13. № 1. P. 82-88.
3. 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. Vol. 50. № 3. P. 183-191.
4. Dmytruk K.V., Sibirny A.A. *Candida famata* (*Candida flareri*) // *Yeast.* 2012. Vol. 29. № 11. P. 453-458.
5. Kerrigan S.W., McDonnell C. Dysregulation of the endothelium following *Staphylococcus aureus* infection // *Biochem. Soc. Trans.* 2015. Vol. 43. № 4. P. 715-719.
6. Kumari V.H., Babu A.R., Srinivas D. et al. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* central nervous system infections – Analysis and outcome // *Br J Neurosurg.* 2015. Vol. 29. № 3. P. 413-418.
7. Peyrani P., Ramirez J. What is the best therapeutic approach to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* pneumonia? // *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2015. Vol. 28. № 2. P. 164-170.

8. Pedrolli D.B., Jankowitsch F., Schwarz J., Langer S., Nakanishi S., Mack M. Natural riboflavin analogs // *Methods Mol Biol.* 2014. Vol. 1146. P. 41-63.
9. Pedrolli D.B., Jankowitsch F., Schwarz J. et al. Riboflavin analogs as antiinfectives: occurrence, modeofaction, metabolismandresistance // *Currharm Des.* 2013. Vol.19; № 14. P. 2552-2560.
10. Pedrolli D.B., Mack M. Bacterial flavin mononucleotide riboswitches as targets for flavin analogs // *Methods Mol. Biol.* 2014. Vol. 1103. P. 165-176.
11. Sambrook J., Fritsh E.F., Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* //NewYork: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989. 253 p.
12. Schwarz J., Konjik V., Jankowitsch F. et al. Identification of the Key Enzyme of Roseoflavin Biosynthesis // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2016. Vol. 10. №55. P. 6103-6106.
13. Voronovsky A., Abbas C., Fayura L. et al. Development of a transformation system for the flavinogenic yeast *Candida famata* // *FEMS Yeast Res.* 2002. Vol. 2. P. 381–388.

Стаття: надійшла до редакції 20.07.16
доопрацьована 5.09.16
прийнята до друку 6.09.16

DEVELOPMENT OF PLATFORM FOR CONSTRUCTING OF AMINORIBOFLAVIN OVERPRODUCERS BASED ON FLAVINOGENIC YEAST *CANDIDA FAMATA*

A. Tsyruľnyk¹, K. Dmytruk¹, D. Fedorovych¹, A. Sybirny^{1,2,*}.

¹*Department of Molecular Genetics and Biotechnology
Institute of Cell Biology, NAS of Ukraine
14/16, Drahomanov St., Lviv 79005, Ukraine*

²*Department of Biotechnology and Microbiology
Faculty of Biology and Agriculture, University of Rzeszow
4, Zelwerowicz St., Rzeszow, 35-601, Poland
e-mail: sibirny@cellbiol.lviv.ua*

Antibiotic roseoflavin and its biosynthetic precursor aminoriboflavin (AF) are produced by gram-positive bacteria *Streptomyces davawensis* and *Streptomyces cinnabarinus*. AF shows a strong antibiotic effect on bacteria *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* and *Micrococcus luteus* being non-toxic to the mammal cells. Production of AF on an industrial scale by recombinant microorganisms has great scientific and practical value. Since AF synthesized from flavinmononucleotide (FMN), which is formed from riboflavin (RF), application of FMN/RF overproducers as basic strains for construction of AF producers gives great advantages. The aim of this work was to achieve the heterologous expression of the key gene of AF biosynthesis *rosB* *S. davawensis*, encoding 8-dimethyl-8-aminoryboflavin-5'-phosphate synthetase in the RF overproducer strain of yeast *Candida famata* AF-4. To achieve a heterologous expression, the *rosB* gene was introduced into the genome of the recipient under the control of a strong constitutive promoter *TEF1* *Debaryomyces hansenii*, encoding elongation translation factor. The transformed strain AF-4 was stabilized, and the presence of gene expression cassette in the genome of the recipient was confirmed by PCR. Introduction of AF biosynthesis genes from the bacterial host strain *S. davawensis*, into the RF/FMN overproducing yeast strains of *C. famata* opens the new opportunities for constructing of AF overproducers.

Keywords: aminoriboflavin, *rosB* gene, *Candida fomata* yeast.

**РАЗРАБОТКА ПЛАТФОРМЫ ДЛЯ СОЗДАНИЯ СВЕРХСИНТЕТИКОВ
АМИНОРИБОФЛАВИНА НА ОСНОВЕ ФЛАВИНОГЕННЫХ
ДРОЖЖЕЙ *CANDIDA FAMATA***

А. Цирульник¹, К. Дмитрук¹, Д. Федорович¹, А. Сибирный^{1,2,*}

¹Отдел молекулярной генетики и биотехнологии
Институт биологии клетки НАН Украины
ул. Драгоманова, 14/16, Львов 79005, Украина

²Отдел биотехнологии и микробиологии, факультет биологии и агрономии
Жешувский университет
ул. Зельверовича, 4, Жешув, 35-601, Польша
e-mail: sibirny@cellbiol.lviv.ua

Антибиотик розеофлавин и его биосинтетический предшественник аминорибофлавин (АФ) синтезируются грамположительными бактериями *Streptomyces davawensis* и *Streptomyces cinnabarinus*. Он оказывает сильное антибиотическое воздействие в отношении бактерий *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* и *Micrococcus luteus* и в то же время не токсичен по отношению к клеткам млекопитающих. Получение АФ в промышленных масштабах с использованием рекомбинантных микроорганизмов со способностью к сверхсинтезу этого антибиотика имело бы большую научно-практическую ценность. Для конструирования микробных продуцентов АФ в качестве исходных микроорганизмов целесообразно использовать имеющиеся сверхсинтетики флавиномононуклеотида (ФМН) и рибофлавина (РФ), поскольку синтез АФ в клетке происходит из ФМН, который, в свою очередь, образуется из РФ. Целью данной работы было конструирование штаммов с гетерологической экспрессией ключевого гена синтеза АФ *rosB* *S. davawensis*, кодирующего 8-диметил-8-аминорибофлавин-5-фосфатсинтазу, в дрожжевом сверхсинтетике РФ, штамме AF-4 *Candida famata*. Для достижения высокого уровня экспрессии ген *rosB* был введен в геном реципиента в составе плазмиды под контролем сильного конститутивного промотора гена *TEF1* *Debaryomyces hansenii*, кодирующего фактор элонгации трансляции. Полученные трансформанты штамма AF-4 стабилизировали, а наличие кассеты экспрессии гена *rosB* в геноме реципиента было подтверждено с помощью ПЦР. Используемый подход позволяет экспрессировать гены биосинтеза АФ *S. davawensis* в дрожжевых сверхсинтетиках РФ / ФМН *C. famata* с целью конструирования сверхсинтетиков АФ.

Ключевые слова: аминорибофлавин, ген *rosB*, дрожжи *Candida famata*.