

Debreceni Egyetem
Természettudományi és Technológiai Kar
Molekuláris Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszék

36. OTDK Biológia szekció



Kompetitív in-host assay fejlesztése a *Saccharomyces 'boulardii'* probiotikus élesztő virulenciájának vizsgálatára

Készítette:

Harmath Andrea
Biotechnológia MSc, II. évfolyam

Témavezetők:

Dr. Pfliegler Valter Péter
egyetemi adjunktus

Imre Alexandra
tudományos segédmunkatárs

Debrecen
2022

Tartalomjegyzék

I. Bevezetés	2
II. Célkitűzés	4
III. Szakirodalmi áttekintés.....	5
3.1 A <i>Saccharomyces 'boulardii'</i> hatásmechanizmusai.....	5
3.2 A <i>S. 'boulardii'</i> alkalmazási területei	6
3.3 Terápiás fehérje termeltetése <i>S. 'boulardii'</i> törzssel	7
3.4 Az élesztőre optimalizált mRFP-t (red fluorescens protein) kódoló plazmid eddigi alkalmazása	8
3.5 A CRISPR/Cas9 rendszer eredete és alkalmazása	9
3.6 Oxford Nanopore Long-read szekvenálás.....	10
IV. Anyagok és módszerek	12
4.1 A transzpozon készlet vizsgálata a <i>S. 'boulardii'</i> izolátumokban	12
4.2 Az integráláshoz használt delta szekvencia azonosítása.....	12
4.3 Élesztősejtek transzformálása	13
4.4 CRISPR plazmid összerakása.....	14
4.6 Plazmidok ellenőrzése	15
4.5 Plazmid long-read alapú szekvenálása (Oxford NanoPore Technologies)	15
V. Eredmények és eredmények tárgyalása	16
5.1 A kísérlet során alkalmazott izolátumok transzpozonkészlete.....	16
5.2 Delta szekvencia és a guide RNS-ek.....	17
5.3 Plazmidok ellenőrzésének eredményei	17
5.4. Az mRFP-t kódoló plazmid transzformálása a <i>S. cerevisiae</i> BY4742 törzsbe	19
5.5 Flongle szekvenálás eredményei	20
5.6 A plazmid szekvenciájának összerakása az EPI2ME szoftverrel	22
5.7 A tervezett primerek a repair DNS amplifikálásához.....	23
VI. Összefoglalás.....	24
Köszönetnyilvánítás	26
Hivatkozások.....	27

I. Bevezetés

A *Saccharomyces 'boulardii'* egy, a *Saccharomyces* nemzetségbe tartozó, probiotikus hatású élesztő, melynek felfedezése Henri Boulard francia tudós nevéhez köthető. Az élesztőt trópusi gyümölcsök felszínéről (licsi, mangosztán) izolálta miután megfigyelte, hogy az őslakosok a gyümölcsök héját fogyasztják, a kolera tüneteinek megelőzése céljából. A probiotikus élesztőt, mely a *Saccharomyces cerevisiae* egyik altípusa (Imre és mtsai., 2019), a bél egészséges működéséhez, valamint hasmenéses megbetegedések megelőzéséhez és kezeléséhez használják (McFarland és Bernasconi, 1993; Liu és mtsai., 2016).

A probiotikumoknak tulajdonított egészségügyi előnyöket már sok évtizede jegyzik szakirodalmi írásokban (Blenchner és mtsai., 1997; Pozzoni és mtsai., 2012). A *S. 'boulardii'*-t probiotikumként, illetve terápiás szerként javasolják, ugyanis jótékony hatást mutat több bélfertőzéssel szemben, valamint alkalmazásával megelőzhetőek a bélrendszeri megbetegedések, mint például a gyulladásos bélbetegségek (Zanello és mtsai., 2009). A *S. 'boulardii'* többféleképpen is képes kifejteni hatását. Az immunrendszer stimulálásával, a gazdaszervezet képes lesz hatékonyabban reagálni és védekezni a kórokozókkal szemben. A probiotikus élesztő megszünteti a hidroelektrolitikus kiválasztás gátlását (*Vibrio cholerae* elleni védekezés), és a bakteriális toxinokkal szemben is tud hatást kifejteni. A bélhám integritásának fenntartása révén, olyan kórokozók ellen is véd, melyek képesek megváltoztatni a membránok permeabilitását, valamint a gyulladásgátló citokinek szekrécióját is zavarják (Dalmasso és mtsai., 2006). A *S. cerevisiae*-t, és így a *S. 'boulardii'*-t is, általánosan biztonságosnak elfogadott (Generally Regarded as Safe; GRAS) mikroorganizmusnak tartják. A gombával végzett probiotikus kezelések a legtöbb esetben biztonságosnak tekinthetők, azonban az utóbbi években több esetben is beszámoltak *S. 'boulardii'* által okozott fungémiáról (Cherifi és mtsai., 2004; McFarland, 2006; Thygesen és mtsai., 2012). A fertőzések gyakoriságáról még nincsenek pontos adatok, azonban már egy amerikai kórházban végeztek felmérést a probiotikus élesztőfertőzések incidenciájával kapcsolatban, és az eredmények alapján az ilyen fertőzések előfordulása összehasonlítható volt a *Candida albicans* által okozott fungémiával (Wombwell és mtsai., 2021). Emellett egy kórházi gyógyszerárban megszüntették a probiotikus élesztő árusítását az egészségügyi kockázatok miatt (Poncelet és mtsai., 2021).

Napjainkban már genetikailag módosított élesztő probiotikum törzsek is létrehozhatóak, és már vannak is erre példák szabadalom formájában. Ilyen egy, a jelen munkánk alapját képző szabadalom is, mely a transzpozonok ill. azok végálló ismétlődéseinek jelenlétét használta ki, és ennek segítségével tudtak sikeres genetikai módosítást végrehajtani (Feng és mtsai., 2018).

Az ehhez hasonló munkák következményeként elképzelhető, hogy a közeljövőben egyre több, úgynevezett designer probiotikum jelenik meg a piacon, amelyek hasznosak a különböző megbetegedések esetén, valamint alkalmazhatóak akár a diagnosztikában is.

II. Célkitűzés

A TDK munkám célja egy olyan *S. 'boulardii'* törzs tervezése volt, amely konstitutívan termel egy szabad szemmel is látható színezettséget okozó, fluoreszcens színmarker proteint (mRFP). Az élesztőre optimalizált, plazmidon kódolt mRFP gént már transzformálták *C. albicans*-ba, mely eredményeképpen a telepek rózsaszínűvé váltak (Keppler-Ross és mtsai., 2008). A munka során a CRISPR/Cas9 rendszer segítségével terveztük integrálni a mRFP-t kódoló ORF-t a probiotikus élesztő genomjába. A Cas9 enzim komplexet képez a guide RNS-el, mely így specifikus kettős szál törést indukál a probiotikus élesztő Ty1 transzpozonjának δ -szekvenciájában, majd homológ rekombinációval az mRFP gént kódoló repair DNS beépül a genom ezen szakaszába.

Az így kapott törzs kontrollként való alkalmazása lehetővé teszi majd más, markert nem termelő élesztő törzsek és izolátumok relatív növekedésének meghatározását (kompetitív assay-ben), így ezt a fejlesztett törzset később alap kutatásban, és akár diagnosztikában is lehet alkalmazni.

A fentiek alapján a következő célokat fogalmaztuk meg:

1. Ty transzpozonkészlet vizsgálata *S. 'boulardii'*-ban
2. Egy olyan régió keresése a *S. 'boulardii'* genomban, ahová egy gén több kópiában integrálható, és az integráció nem zavarja meg az élesztő számára esszenciális gének és folyamatok működését.
3. Guide RNS-ek tervezése a probiotikus élesztő genomszakaszára, ahová az mRFP marker integrálható.
4. Az mRFP-t kódoló plazmid szekvenálása az integrálandó mRFP ORF, promóter és terminátor szekvenciájának pontos meghatározásához.
5. Primerek tervezése az mRFP-t kódoló kazetta plazmidról való amplifikálása céljából. [Tehát, a repair DNS (rDNS) kazetta amplifikálása].

III. Szakirodalmi áttekintés

3.1 A *Saccharomyces 'boulardii'* hatásmechanizmusai

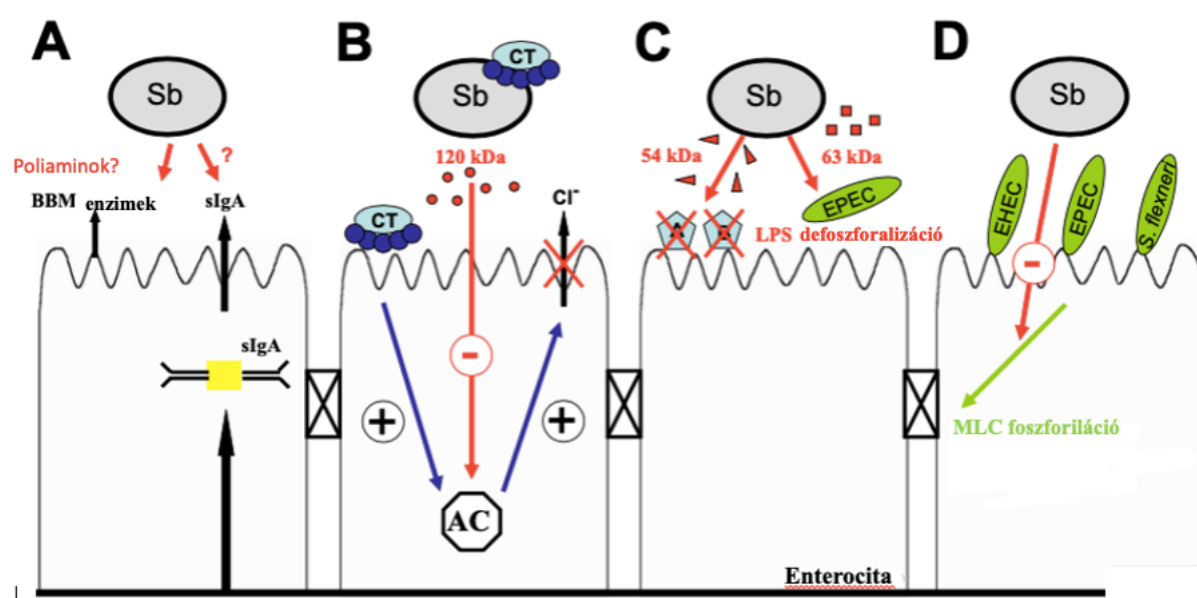
A probiotikumoknak tulajdonított egészségügyi előnyök már sok évtizede ismertek (Blenchner, 1997; Pozzoni, 2012). A gyomor- és bélrendszeri betegségek tüneteinek enyhítése és megelőzése is ide tartozik (például akut vagy krónikus bélbetegségek), valamint megemlíthető még a hüvelyi és húgyúti fertőzések kezelése is. A *S. 'boulardii'* a már ismert bakteriális probiotikumokhoz hasonlóan jótékony hatást mutat több bélfertőzéssel szemben, valamint alkalmazásával megelőzhetőek, illetve kezelhetőek a gyulladásos bélbetegségek is. Napjainkban az akut és krónikus hasmenés megelőzésére és kezelésére is egyaránt alkalmazzák ezt az élesztőt. Antibiotikumok használata esetén jelentősen csökkenti a velejáró hasmenés időtartamát és előfordulását az alkalmazás alatt (Zanello, 2009).

A *S. 'boulardii'* többféleképpen is képes kifejteni hatását. A különböző mechanizmusok révén képes enyhíteni a megbetegedést okozó mikroorganizmusok káros hatásait. Az első esetben (1/A ábra), a *S. 'boulardii'* egy olyan védelmi mechanizmusa látható, mely során, a gazdaszervezetbe kerülve, annak immunrendszerét stimulálja (Zanello, 2009). Ezáltal a szervezet képes lesz hatékonyabban reagálni, és védekezni a kórokozókkal szemben. Fokozza mind a szekréción IgA, mind pedig a kefeszegély-enzimek expresszióját.

A *Vibrio cholerae* esetében a hidroelektrolitikus egyensúly felborulását jegyezték fel (Vidon, 1986; Czerucka, 1989; Czerucka, 1994). A baktérium egy két alegységből álló toxint termel (kolera toxin; CT). Az egyik alegységgel kapcsolódik a bélben lévő receptorához, a másik alegység pedig az adenilát-cikláz (AC) aktiválódását katalizálja. Ez az aktiválódás a cAMP szintjének növekedéséhez vezet. Végeredményképpen emelkedik a kloridionok szekrécója a béllumenbe. A hidroelektrolitikus folyadék ilyen nemű zavarai súlyos hasmenéshez vezetnek. Ebben az esetben a *S. 'boulardii'* egy fehérje termelésével, az AC aktivitását gátolja, így csökkentve a klorid-ionok szekrécóját (1/B ábra).

A *S. 'boulardii'* bakteriális toxinokkal szemben is hatást fejthet ki (1/C ábra). Ebben az esetben a *Clostridioides difficile* által okozott fertőzés van szemléltetve, mely az antibiotikummal összefüggő hasmenés leggyakoribb okozója. A baktérium A és B toxint termel. Ezek a toxinok képesek bélgyulladást és nyálkahártya sérülést is kiváltani. A probiotikum mindkét toxint gátolja, proteináz termelése következtében. Emellett protein-foszfataz termelés révén képes defoszforilezni az enteropatogén *Escherichia coli* lipopoliszacharidját (LPS).

A kórokozók képesek megváltoztatni a membránok permeabilitását, valamint a gyulladásgátló citokinek szekrécióját is zavarják. A *S. 'boulardii'* ezeknek az elváltozásoknak a helyreállítását segíti elő (1/D ábra). Ezeket a változásokat az enterális *E. coli* kórokozók (EHEC, EPEC) váltják ki (Dalmasso, 2006; Mummy, 2008; Zanello, 2009).



1. árba A: immunmoduláló hatás, B: hidroeletrolitikus kiválasztás gátlása, C: bakteriális toxinok semlegesítése, D: bélhám integritásának fenntartása (Zanello, 2009)

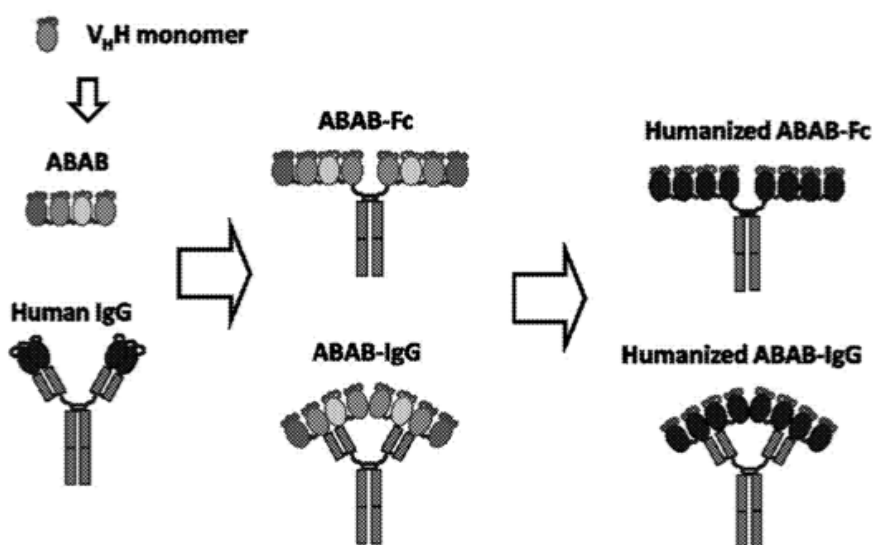
3.2 A *S. 'boulardii'* alkalmazási területei

A *S. 'boulardii'* élesztőt tartalmazó probiotikumok az egyik legnépszerűbb probiotikumoknak számítanak. Napjainkban már világszerte több, mint 80 országban forgalmazzák ezeket a termékeket, különböző gasztrointesztinális problémák (antibiotikum okozta hasmenés, *C. difficile* és *Helicobacter pylori* fertőzés, irritábilis bélszindróma) kezelésére (Plaza-Diaz és mtsai., 2019; Paisés mtsai., 2020). Egészségügyi előnyei ellenére használatával fennáll a fungémia kockázata immunhiányos vagy súlyos betegek, csecsemők és idős emberek körében. Az elmúlt években egyre több ilyen esetet jelentettek, köztük két COVID-19 beteget (Ventoulis és mtsai., 2020) és egy csecsemőt (Chakravarty és mtsai., 2019), akik probiotikus élesztő kezelésben részesültek. Emiatt indokoltá vált a *S. boulardii* probiotikum termékek olyan továbbfejlesztése, ami az általuk okozott kockázatok csökkentését célozza meg (Lefevre és mtsai., 2015). A kockázatok csökkentése mellett a probiotikumok hatásainak pontossága, precizitása is fontos, mivel tovább növelné ezeknek a termékeknek a

hatásosságát. Erre megoldást az úgynevezett designer probiotikumok kínálnak, amik egyes betegségek konkrét patomechanizmusát célozzák meg, terápiás hatású fehérjék heterológ expresszióján keresztül (Vandeputte, 2020). Ilyen jellegű fejlesztést célzó tanulmány baktériumok esetében már megjelent (Goh és Barrangoua, 2021), és a *S. boulardii* esetében is rendelkezésre állnak azok az eszközök, amivel designer probiotikumká való fejlesztése lehetséges.

3.3 Terápiás fehérje termeltetése *S. 'boulardii'* törzsszel

Egy, a munkánk alapját is képező szabadalomban a *S. 'boulardii'*-t, valamint a *S. cerevisiae*-t génmódosítás segítségével felhasználták antitestek konstitutív termeltetésére (Chen és mtsai., 2020). Humán immunoglobulinból származó antitest-alapú kötőanyagokat, valamint ezen kötőanyagok kiválasztására képes módosított élesztő törzset hoztak létre, *C. difficile* toxinok semlegesítésére (2. ábra).



2. ábra A *C. difficile* toxinok megkötésére képes antitestek, (Feng és mtsai., 2018)

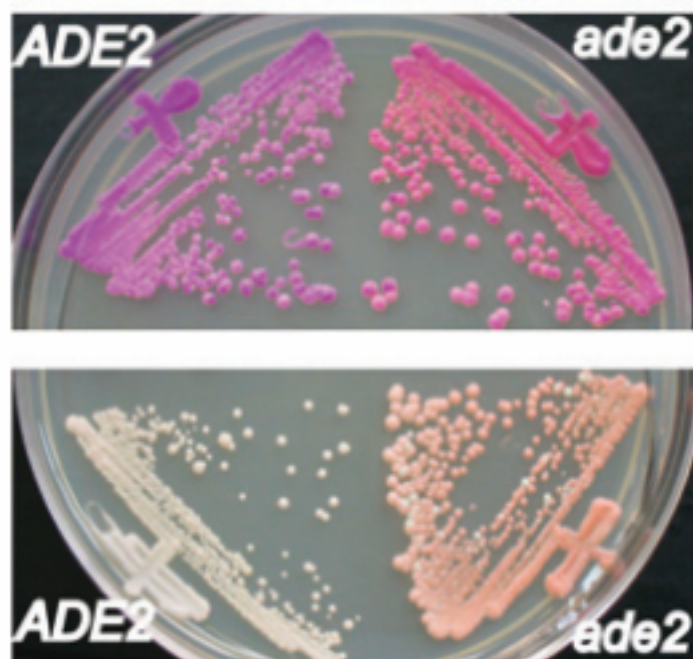
A módosított törzseket úgy tervezték meg, hogy az antitestekből minél nagyobb mennyiséget termeljenek. Az antitesteket kódoló gének integrálása céljából használt technológia a CRISPR/Cas9 volt. Az integráció helyeként a *Saccharomyces* genomban gyakran előforduló transzpozonokat választották, pontosabban azok delta szekvenciáit (hosszú végálló

ismétlődések; LTR). A transzpozonok többnyire több kópiában előforduló, ugráló szekvenciák a genomban. Így biztosították a többszöri integrációt, ezáltal pedig a több antitest termeltetését. A *S. cerevisiae* esetében ismert, hogy az 5 féle Ty transzpozon (Ty1-5) 51 kópiában, valamint 251 δ -szekvencia van jelen a genomjában, mely transzpozonok végén LTR szekvenciák találhatók. A *S. 'boulardii'*-val kapcsolatban kevés adat állt rendelkezésre a δ -szekvenciákról, így Feng és mtsai. (2018) ilyen szemszögből is megvizsgálták a probiotikus élesztő genomját. A szerzők 57 δ -szekvenciát találtak, ami jelentősen kevesebb, mint a *S. cerevisiae* genomban található δ -szekvenciák száma. Ezt követően az ABAB kazetta és a CRISPR plazmid segítségével végrehajtották az antitesteket kódoló gének integrációját a genomba (Feng és mtsai., 2018).

3.4 Az élesztőre optimalizált mRFP-t (red fluorescens protein) kódoló plazmid eddigi alkalmazása

Szakirodalomban leírtak egy olyan plazmidon kódolt színmarkert, amelynek élesztőben történő expressziója lila színű telepeket eredményez. Ezen tulajdonság a plazmid fenntartásának gyors szűrését teszi lehetővé *S. cerevisiae* sejtekben (Keppler-Ross és mtsai., 2008).

Az RFP, egy vörös fluoreszcens fehérje, mely széles körben alkalmazott fluoreszcens fehérje emlőssejt vizsgálatok során, azonban *S. cerevisiae*-ben való expressziójuk az AT régiók gyakorisága, valamint az inkompatibilis kodonhasználat miatt alacsony. Ezért a kodonok optimalizálása révén elérték, hogy megfelelően expresszálódjon élesztőben is (yEmRFP; Keppler-Ross és mtsai., 2008). A kísérlet elején észrevették, hogy az yEmRFP plazmidon keresztül, az mRFP-t termelő élesztő, szokatlanul élénk fenotípust mutat (3. ábra). Ennek okát az általuk alkalmazott ade2 mutáns törzzsel hozták összefüggésbe, mely mutáns purin prekursorok felhalmozása miatt vöröses színű (Roman, 1956). Ez azonban megdőlni látszott, ugyanis a vad típusú (ADE2, fehér színű telep), yEmRFP-t expresszáló törzs is lila színű lett, bár eltérő árnyalatú (3. ábra).



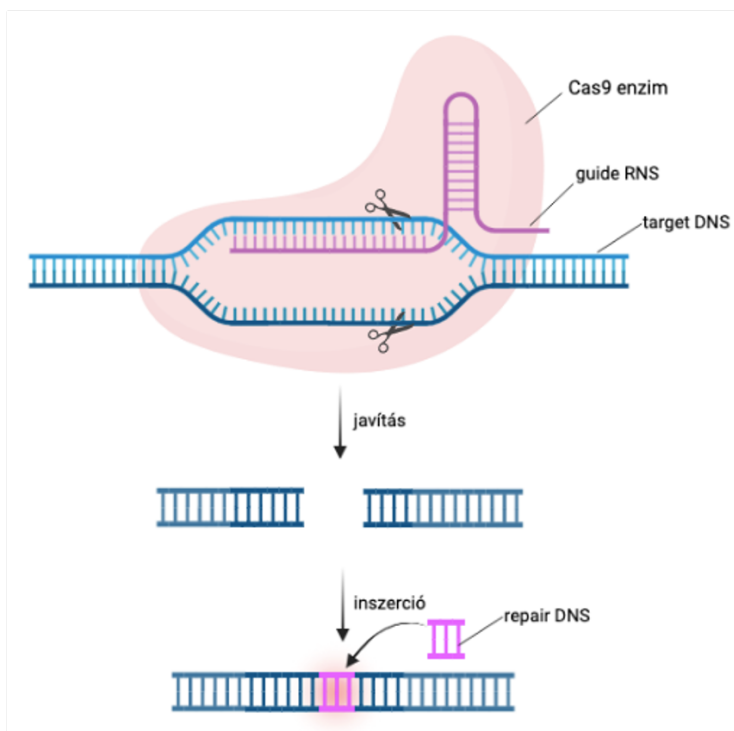
3. ábra yEmRFP fenotípusok ADE2 (vad típus) és *ade2* (mutáns) törzsekben (Keppler-Ross és mtsai., 2008)

Fontos különbség volt még a lila és vörös fenotípusok között a szín kialakulásának az ideje. Az yEmRFP plazmidot hordozó lila sejtek esetében, egy éjszakán át tartó inkubációt követően könnyen megkülönböztethetők voltak a telepek a kontroll plazmidot hordozóktól. Ezzel szemben az *ade2*-függő vörös szín kialakulásához legalább 3-5 napra volt szükség. Ezzel azt bizonyították, hogy a lila szín fenotípusa az yEmRFP expressziójának köszönhető. Az yEmRFP által biztosított élénk szín hasznos új marker lehet a plazmidfelvételt, fenntartást és stabilitást befolyásoló genetikai események nyomon követésére (Keppler-Ross és mtsai., 2008).

3.5 A CRISPR/Cas9 rendszer eredete és alkalmazása

A CRISPR rendszer alapvetően a baktériumok és archeonok védelmi rendszereként, adaptív immunrendszereként szolgált, mely révén RNS vezérelte DNS hasítás történt, így megvédve magukat a behatoló vírusokkal szemben. A rendszer működése során, az idegen DNS felismerhető és beilleszthető a gazda szervezet genomjának valamely lókuszába (Ma és mtsai., 2014). Ezen természetes folyamatot kihasználva, tudósok genomszerkesztési módszert fejlesztettek ki belőle. A Cas9 (nukleáz) szerepe ebben a rendszerben, hogy a guide RNS (gRNS) segítségével (mely a behatoló DNS-ről íródott) kettős szálú DNS törést hoz létre a genomban. A lókusz, ahol az enzim vág, ebből kifolyólag specifikussá tehető, annak megfelelően, hogy

hova tervezzük a gRNS-t. A kettősszáltörés élesztősejtekben jellemzően letális, ez pedig beindítja a sejt DNS javító mechanizmusait, mely során az élesztő a homológ rekombinációt részesíti előnyben, amennyiben van olyan homológ DNS szakasz, amivel ki tudja javítani a hibát. Ezen szakasz lesz a repair DNA (rDNS) (Akhmetov és mtsai., 2018; 4. ábra).



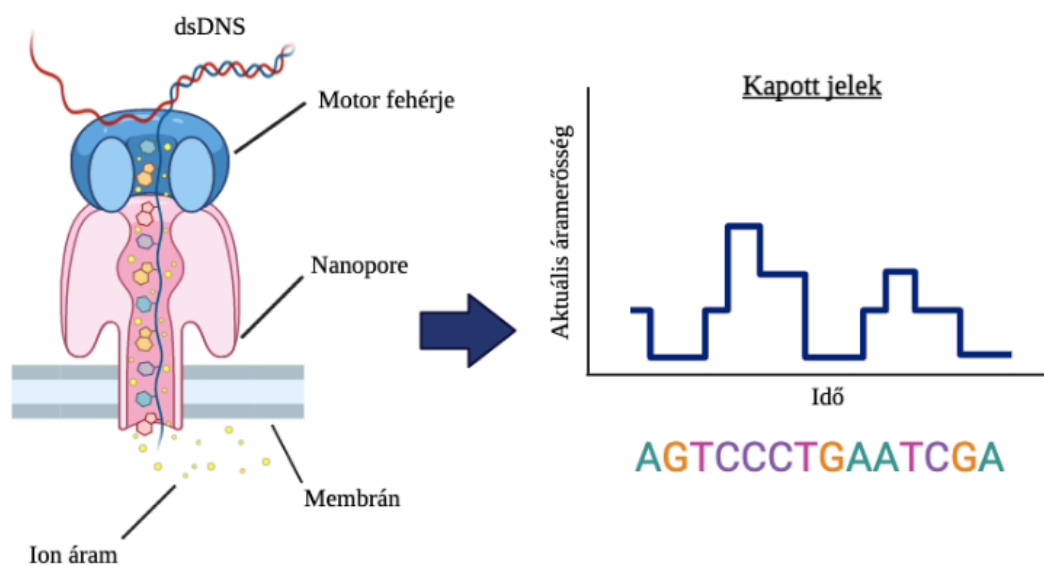
4. ábra CRISPR mechanizmusa (Biorender, <https://biorender.com/>)

3.6 Oxford Nanopore Long-read szekvenálás

A Oxford Nanopore Technologies cég által kifejlesztett szekvenálás egy olyan szekvenálási módszer, mely lehetővé teszi hosszú DNS és RNS fragmentek elemzését. Működésének alapja a feszültség változásának folyamatos elemzésén alapszik, mely változást fehérje pórusokon áthaladó különböző nukleinsavak okoznak. A kapott jelek dekódolásával (basecalling) kaphatjuk meg az adott DNS vagy RNS minta szekvenciáját (5. ábra).

A szekvenálás elvégezhető egy mobiltelefon méretű eszközzel, így gyakorlatilag bárhol elvégezhető egy szekvenálás, nem feltétlenül szükségesek laboratóriumi körülmények a sikeres elemzés elvégzéséhez. Akár több tízezer hosszúságú olvasatok is keletkezhetnek, mely az ismétlődő régiók pontos szekvenálását teszi lehetővé (Wu és mtsai., 2022). A szekvenálást valós időben nyomon lehet követni az ugyanezen cég által fejlesztett MinKNOW szoftver

segítségével, ami lehetővé teszi a keletkezett adatmennyiség meghatározását (<https://nanoporetech.com/>).



5. ábra Oxford Nanopore long-read szekvenálás (Biorender, <https://biorender.com/>)

IV. Anyagok és módszerek

4.1 A transzpozon készlet vizsgálata a *S. 'boulardii'* izolátumokban

A kísérletek során két kereskedelmi (PY0003, PY0004) és hat klinikai izolátum (551/2018, DE27020, DE3912, DE42533, DE42807, DE45866) Illumina teljesgenom szekvenálásból származó olvasatait használtunk fel. Mindegyik izolátum esetében rendelkezésünkre álltak a betegek, és a gyűjtésre vonatkozó adatok is, melyeket az 1. táblázat tartalmaz. Az olvasatokat rátérképeztük a *S. cerevisiae* S288C típustörzsre, majd a Bedtools alkalmazásával kapott lefedettségi adatok alapján meghatároztuk az egyes transzpozon típusok kópiaszámát.

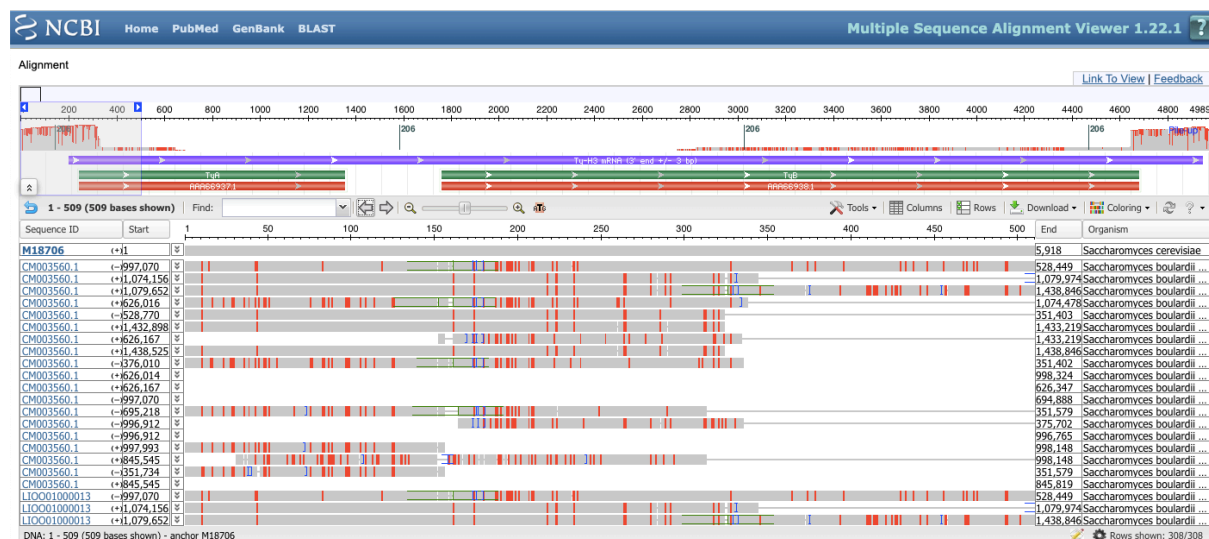
1. táblázat A szekvenált *S. 'boulardii'* izolátumokra vonatkozó adatok

NCBI	Típus	Formulázás		Termék fajösszetétele	Beszerezés helye	Izolálás ideje	Gyártási ország
PY0003	kereskedelmi izolátum	szárított		<i>Saccharomyces 'boulardii'</i> + <i>Lactobacillus Rhamnosus</i>	Debrecen	2017. szept.	Csehország
PY0004	kereskedelmi izolátum	szárított		<i>Saccharomyces 'boulardii'</i> + <i>Lactobacillus Rhamnosus</i>	Debrecen	2017. nov.	Csehország
ID	Típus	Életkor	Nem	Egészségi állapot az izoláláskor	Mintavétel helye	Mintavétel ideje	Földrajzi hely
DE3912	klinikai izolátum	85	♂	tüdőgyulladás	légcső	2018. jan.	DE Klinika Központ
DE27020	klinikai izolátum	40	♀	szepszis (bakteriális)	hörgő	2015. aug.	DE Klinika Központ
DE42533	klinikai izolátum	2	♂	folyadék homeosztázis zavar	torok	2017. dec.	DE Klinika Központ
DE42807	klinikai izolátum	1	♀	hasmenés	hüvely	2017. dec.	DE Klinika Központ
DE45866	klinikai izolátum	64	♂	agyi infarktus	hörgő	2017. dec.	DE Klinika Központ
551/2018	klinikai izolátum	81	♂	paralitikus ileusz	széklet	2018. jan.	DE Klinika Központ

4.2 Az integráláshoz használt delta szekvencia azonosítása

A Ty transzpozonok δ - (delta-) szekvenciáinak a megtalálásához (melyek a transzpozonok hosszú végálló ismétlődései) a Ty1-H3 szekvenciát használtuk kiindulási szekvenciaként (Genebank akcessziós szám: M18706), melyet az NCBI BLAST funkciójának segítségével megkerestünk a *S. 'boulardii'* genomban. A kereséskor az alapértelmezett

beállításokat használtuk. Ezt követően a találatok között leggyakrabban előforduló δ -szekvenciát a Multiple Sequence Alignment (MSA) Viewer segítségével jelenítettük meg (6. ábra).



6. ábra Ty-H3 transzpozon szekvenciája a *S. 'boulardii'* genomjában

Az általunk választott δ -szekvencia a Ty1-H3 transzpozon 5' végén található (1-334. bázisok). Ezt a szekvencia részletet letöltöttük az NCBI adatbázisból .fasta formátumban, majd a Benchling online szoftver segítségével terveztük meg rá a 20 bp hosszúságú gRNS-t kódoló oligonukleotid DNS szekvenciákat. A munka során két gRNS szekvenciát terveztünk, arra az esetre, ha az egyik nem működne (Akhmetov és mtsai., 2018). A tervezett két gRNS szekvencián módosításokat végeztünk: A forward (FWD) szál 5' végén a Benchling által 21. bázisként beépített G-t, TT bázisokkal helyettesítettük, a komplementer reverse (REV) szál 3' végére pedig két A bázist illesztettünk. A REV szál 3' végére pedig egy CAAA túlnyúló véget terveztünk (Akhmetov és mtsai., 2018).

4.3 Élesztősejtek transzformálása

Az élesztő transzformációkat Lee és mtsai. (2015) munkássága alapján végeztük el, az alábbi módosításokkal: (1) a transzformáció előtt az élesztősejteket 20 ml élesztő pepton-dextróz tápközegben tenyésztettük (YPD; 1% élesztőkivonat, 2% mikológiai pepton, 2% glükóz, 2% agar, pH 5,6); (2) a transzformáció összeállításakor (végtérfogat 50 μ l) a

sejteket 33,33 µl 50%-os PEG 3350-nel (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), és 1,39 µl forralt (95 °C, 5 perc) lazac spermium DNS-sel (Sigma-Aldrich), 5 µl 1 M lítium-acetáttal (pH 7,5), 4,28 µl steril desztillált vízzel, 200 ng Cas9/gRNS-t expresszáló plazmiddal és 1000 ng rDNS-sel kevertük össze; (3) a 42 °C-os 30 perces hősokk előtt a transzformációs keveréket 30 °C-on 30 percig inkubáltuk; (4) az URA szelekció előtt a sejteket centrifugáltuk és YPD-ben újraszuszpendáltuk. A transzformánsok szelekciójához uracilt nem tartalmazó szintetikus dextróz táptalajt (SD; 2% glükóz, 0,17% "yeast nitrogen base" (aminosavak nélkül), 0,2% uracil-mentes szintetikus drop out táptalaj szupplement, 2% agar) használtunk.

4.4 CRISPR plazmid összerakása

A fluoreszcens fehérje (mRFP) *S. 'boulardii'* élesztőbe történő inzerciójához szükséges CRISPR/Cas9 rendszer elemeit a Benchling online szoftver (<https://benchling.com/>) segítségével terveztük és raktuk össze.

A Cas9-et és a gRNS-t expresszáló plazmidot Golden Gate reakcióval állítottuk össze három plazmid felhasználásával: egy gRNS kazetta plazmid, egy Cas9 kazetta plazmid és egy úgynevezett multigén vektor alkalmazásával történt az összeállítás, amelyből a multigén vektor tartalmazta a nourseothricin élesztő szelekciós markert. Az utóbbi két plazmid már rendelkezésünkre állt, így csak a gRNS kazetta plazmid összeállítását végeztük el. Ezt a pYTK003, pYTK072 és PYTK095, valamint a pYTK050-sgRNS plazmidok felhasználásával állítottuk össze Golden Gate reakcióval. A pYTK050-sgRNS plazmid összerakásához először PCR készülék segítségével hibridizáltuk a gRNS-t kódoló DNS szakasz két szálát, majd Golden Gate reakcióval a pYTK050 plazmidba klónoztuk. A klónozási lépésekhez ultrakompetens *E. coli* DH5α sejteket használtunk, amelyeket transzformáció után a megfelelő antibiotikumokat (ampicillint, kloramfenikolt vagy kanamicint) tartalmazó lizogén táptalaj (LB: 1% pepton, 1% NaCl, 0,5% élesztő kivonat, 1,5% agar; Miller) agarlemezeken szelektáltunk. A transzformációkat hősokk módszerrel végeztük (Inoue és mtsai., 1990), melyet 14-20 óra inkubálás követett. A plazmid izoláláshoz a Monarch Plasmid Miniprep Kitet (T1010L) használtuk, a gyártó utasításai alapján.

4.6 Plazmidok ellenőrzése

A plazmidok helyes összerakását restrikciós emésztéssel ellenőriztük, melyet gélen való futtatás követett. A gélelektroforézishez 1%-os alacsony elektroendozmózisú (LE) agaróz gélét használtunk, Tris-acetát-EDTA (TAE) pufferrel.

A pYTK050-sgRNS plazmidok ellenőrzését Sanger szekvenálással végeztük, hogy megbizonyosodjunk arról, hogy gRNS-t kódoló szakaszban nem történt mutáció. A gRNS kazetta plazmidok ellenőrzéséhez NotI restrikciós enzimet használtunk. A reakcióhoz 12 µl MilliQ vizet; 1,5 µl 10x FD Green puffert; 1 µl NotI-FD-t és 0,5 µl plazmidot használtunk, melyet egy óra 37 °C-on való inkubálás követett. A végső plazmid ellenőrzését, amely kódolja a Cas9-t, a gRNS-t és a marker gént (nourseothricin), ScaI restrikciós enzimmel végeztük. A reakcióhoz 12 µl MilliQ vizet; 1,5 µl 10x ScaI puffert; 0,5 µl ScaI-t és 1 µl plazmidot használtunk, melyet két óra 37 °C-on történő inkubálás követett.

4.5 Plazmid long-read alapú szekvenálása (Oxford Nanopore Technologies)

Az Oxford Nanopore által javasolt plazmid szekvenálási lépéseket követve, először az mRFP-t kódoló plazmidot felhasználva a cég utasításainak megfelelően Rapid Barcoding Kit segítségével (SQK-RBK004, Oxford Nanopore) könyvtárat elkészítettünk, majd ezt követően a szekvenálást az Oxford Nanopore Technologies MinION készülékével végeztük el, egy Flongle flow Cell alkalmazásával. Az ehhez alkalmazott számítógépes szoftver a MinKNOW volt. Mind a hardveren, mind pedig a Flongle flow cell-n ellenőrzést futtattunk, hogy megbizonyosodjunk a megfelelő működésükről, valamint az elegendő mennyiségű pórusszámról. Ezt követően kicseréltük a készülékben a megfelelő tárolási körülményeket biztosító puffert, 120 µl priming mixre. Ezután ugyan ezen C nyíláson keresztül adagoltunk be a könyvtárat is. 24 órára állítottuk a szekvenálás időtartamát.

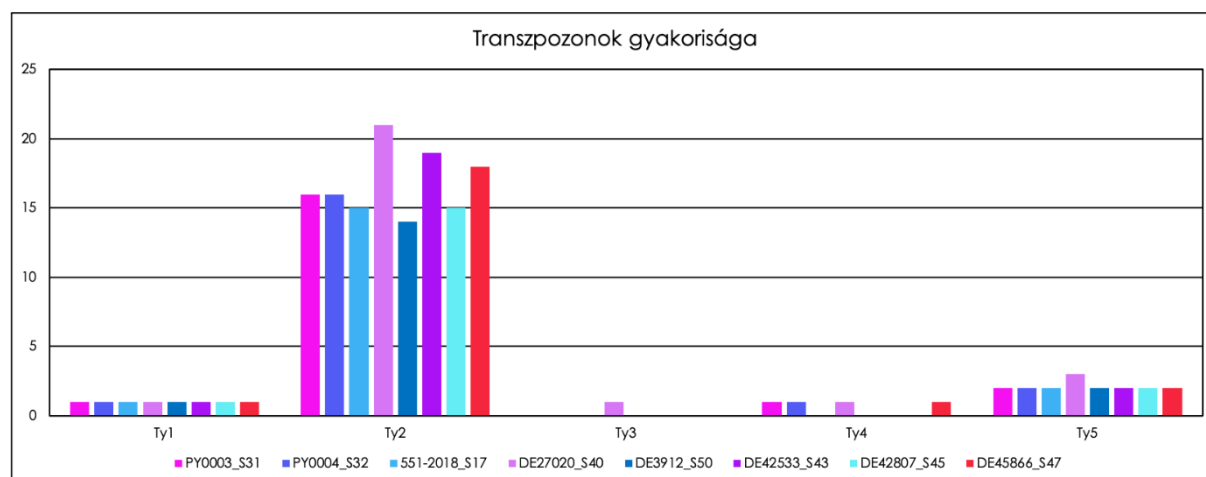
Az eredményeket a szekvenálás végén FAST5 fájlkként kaptuk meg. A kapott fájlokon basecallt végeztünk a Guppy 5.0.11 szoftverrel, mely eredményeképpen FASTQ fájlokat kaptunk. Végül az EPI2ME szoftveren lefutattuk a Clone Validation Workflow-t, ami a FASTQ fájlokból összerakta és annotálta a plazmidot. Az EPI2ME-n belül több alszoftver együttes munkájával kaptuk meg az eredményeket: a Canu segítségével történt a plazmid szekvencia összerakása, a TryCycler a szekvenciát cirkularizálta, a Medaka segítségével készült a pontosított konszenzus szekvencia, valamint a pLannonate végezte az annotációt.

V. Eredmények és eredmények tárgyalása

5.1 A kísérlet során alkalmazott izolátumok transzpozonkészlete

Ismert, hogy a *S. cerevisiae* genomjában öt fajta transzpozon (Ty1/2/3/4/5) található meg, a *S. 'boulardii'* esetében azonban a Ty1/3/4 transzpozonok hiányoznak (Khatri és mtsai., 2017). A Molekuláris Biotechnológiai és Mikrobiológiai Tanszék törzsgyűjteményében megtalálható két kereskedelmi (PY0003, PY0004) és hat klinikai probiotikus élesztő izolátum (551/2018, DE27020, DE3912, DE42533, DE42807, DE45866) esetében a transzpozonkészlet nem volt ismert. Ezért az izolátumok Illumina szekvenálásból származó olvasatait, a *S. cerevisiae* S288C típus-törzsre térképeztük, majd a lefedettségi adatok alapján meghatároztuk az egyes izolátumokban megtalálható transzpozonok kópiaszámát.

Eredményeink azt mutatták, hogy mind a nyolc izolátumban hasonló kópiában fordultak elő az egyes transzpozonok (7. ábra). Jellemzően a Ty2/5 transzpozonok több kópiában fordultak elő, a Ty1/3/4 transzpozonok pedig nagyrészt hiányoztak az izolátumokból. Ezek az eredmények összhangban vannak a már szakirodalomban leírtakkal. Tehát elmondható, hogy a kísérletekhez használt izolátumok transzpozonkészlete nem tért el jelentősen az eddig publikált és ilyen szempontból is vizsgált izolátumok transzpozonkészletétől.



7. ábra Az általunk vizsgált *S. 'boulardii'* izolátumok transzpozonkészlete

5.2 Delta szekvencia és a guide RNS-ek

A delta szekvencia keresésekor a leggyakrabban előforduló szekvencia részletet választottuk az NCBI MSA Viewer segítségével, mely a 1-322. bp-ig tartó részlet volt. Ezt követően a Benchling segítségével terveztünk a delta szekvenciára két gRNS-t (8. ábra, 2. táblázat).



8. ábra Delta szekvencia

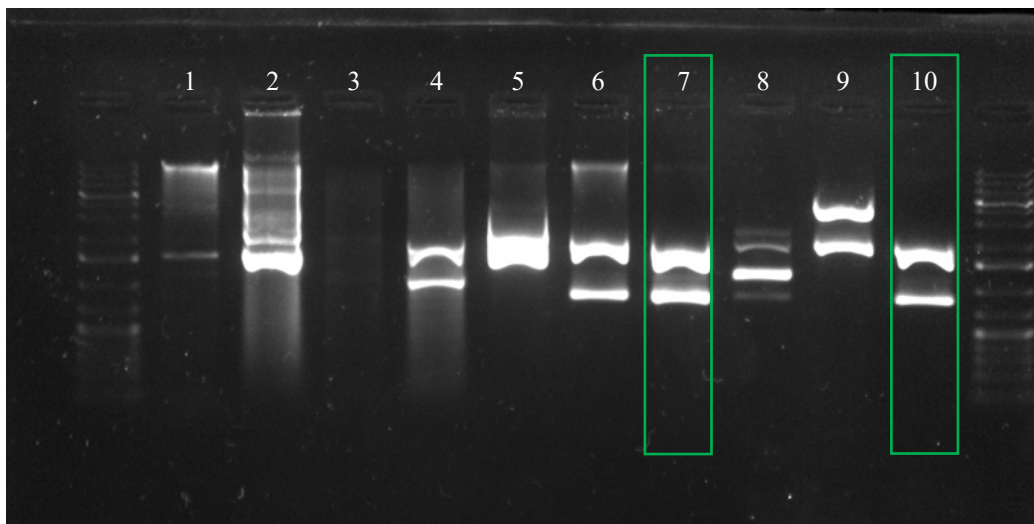
2.táblázat gRNS oligonukleotidok

guide RNS_1 FWD	67,7 on-target score 100 off-target score	5'-gactTTTTAGTGGAAGCTGAAACGCA-3'
guide RNS_1 REV	67,7 on-target score 100 off-target score	5'-aaacTGCGTTTCAGCTTCCACTAAAA-3'
guide RNS_2 FWD	70,9 on-target score 99,9 off-target score	5'-gactTTTATACTAGAAGTTCTCCTCG-3'
guide RNS_2 REV	70,9 on-target score 99,9 off-target score	5'-aaacCGAGGAGAACTTCTAGTATAAAA-3'

5.3 Plazmidok ellenőrzésének eredményei

Az sgRNS-pYTK050 plazmidot Sanger szekvenálással ellenőriztük, hogy a gRNS tenylegesen inzertálódott e a plazmidba. A gRNS kazetta plazmid, illetve a végső plazmid összerakását, klónozását és izolálását követően a megfelelő restrikciós enzimmal (NotI, ScaI) emésztettük a plazmidokat a gélelektroforézissel történő ellenőrzéshez. Először a gRNS kazetta

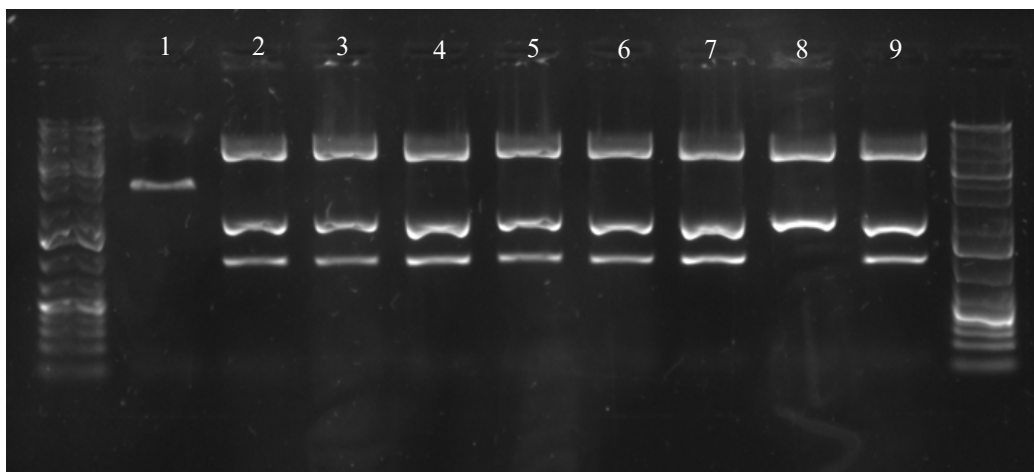
plazmidot emésztettük a NotI enzimmal. A gélelektroforézis ebben az esetben két sávot eredményezett, egy 821 bp hosszúságú sávot, mely maga az inzert volt (ConL1-sgRNS-ConR1), és egy 1858 bp hosszúságú sávot (pYTK095 backbone). Ez az eredmény azt mutatta, hogy a Golden Gate reakció sikeres volt (9. ábra).



9. ábra A gRNS kazetta plazmid restrikciós emésztése NotI enzimmal (1: hibás backbone plazmid, 2: megfelelő backbone plazmid, 3: hibás backbone plazmid emésztése NotI enzimmal, 4: megfelelő backbone plazmid emésztése NotI enzimmal, 5: kontroll_1 plazmid, 6: kontroll_2 plazmid, 7: gRNS_1-1 kazetta plazmid, 8: gRNS_1-2 kazetta plazmid, 9: gRNS_2-1 kazetta plazmid, 10: gRNS_2-2 kazetta plazmid)

A gélfotó alapján a különböző izolálásokból származó plazmid mintákat összehasonlítottuk a kontroll_1 és kontroll_2 plazmidokkal, valamint a megfelelő backbone plazmiddal. Ez alapján gRNS_1-1, valamint a gRNS_2-2 plazmid minták mutatták a helyes sávmintázatot, így a következő Golden Gate reakcióban ezeket használtuk.

A második Golden Gate reakció esetében a későbbi élesztő transzformáláshoz használni tervezett plazmidot emésztettük az ScaI enzimmal. Az enzim három helyen vágta a plazmidot, így a gélen három sávot kaptunk: Egy 6695bp hosszúságú sávot, mely a plazmid-Cas9-sgRNS-Nat szakasza, valamint egy 870 bp és egy 1557 bp hosszú szakaszt (10. ábra).



10. ábra Az élesztő transzformálásához használni tervezett plazmid ScaI restrikciós enzimmal történő ellenőrzése (1: backbone plazmid, 2: kontroll_1 plazmid, 3: kontroll_2 plazmid, 4-6: első gRNS szekvenciát kódoló plazmid, 7-9: második gRNS szekvenciát kódoló plazmid)

Ennél a lépésnél ismét összehasonlítottuk a különböző izolálásból származó plazmid minták sávmintázatait a backbone plazmideval, valamint korábbi kísérletekből származó és bizonyítottan működő plazmidokéval. A minták többsége a várt sávmintázatot mutatta a 8. minta kivételével, így ez utóbbit leszámítva a többi minta használható lesz az mRFP integrálása során.

5.4. Az mRFP-t kódoló plazmid transzformálása a *S. cerevisiae* BY4742 törzsbe

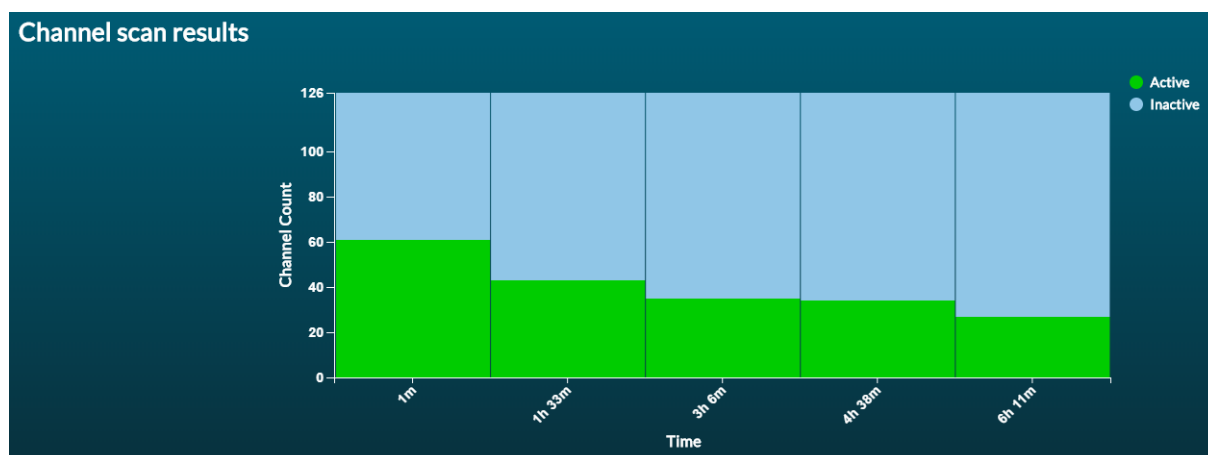
Annak ellenőrzésére, hogy a plazmidon lévő mRFP gén expressziója lila színű telepeket eredményez, transzformáltuk azt a *S. cerevisiae* BY4742 uracil auxotróf törzsbe. A transzformálást követően az élesztő normál, fehér színű telepei helyett lila telepeket kaptunk, amely azt jelentette, hogy az RFP-t kódoló plazmidról sikeresen kifejeződött a gén, és így elszíneződtek a telepek (11. ábra).



11. ábra RFP-t kifejező lila színű élesztő

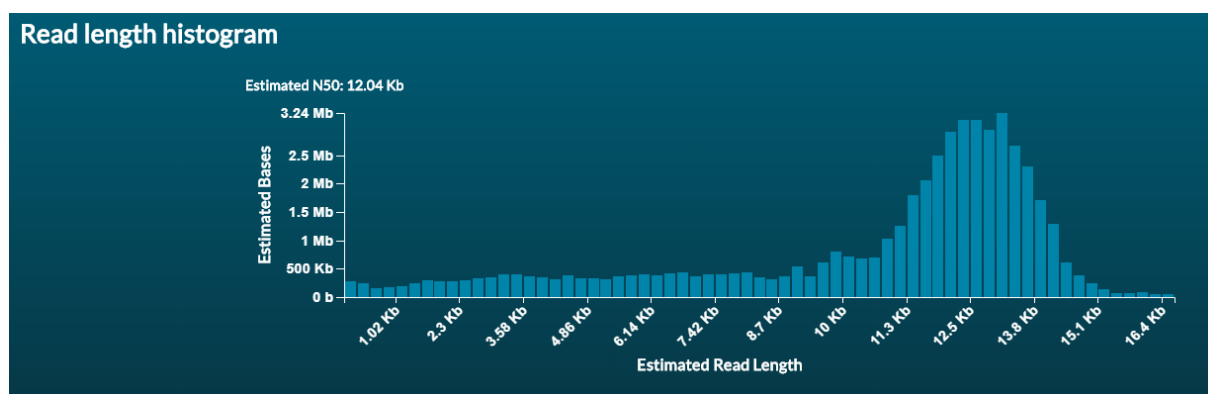
5.5 Flongle szekvenálás eredményei

A rDNS egy lineáris DNS szakasz, mely a következő szekvenciárészekből áll össze: 5' és 3' homológ régiók a genomba való beépüléshez, az integrálni kívánt gén (esetünkben az élesztőre optimalizált mRFP), valamint a gén promóter és terminátor régiója. A rDNS-t az előzőleg összerakott plazmiddal együtt szükséges transzformálni az élesztőbe. A rDNS szekvenciája (pontosabban az mRFP gén, valamint annak promóter és terminátor régiója) a mi esetünkben plazmidon volt kódolva, így PCR reakcióval terveztük azt amplifikálni. A PCR-hez szükséges primereket azonban nem tudtuk megtervezni, mivel a terminátor régió szekvenciája nem volt ismert. Így az Oxford Nanopore Technologies MinION készülékével megszekvenáltuk a plazmidot, valamint az EPI2ME szoftverrel annotáltuk is. A könyvtár elkészítését követően a MinION készüléket előkészítettük. Leellenőriztük a hardvert, hogy megbizonyosodjunk a készülék állapotáról, valamint a Flongle flow cell-t is (Típus: FLO-FLG001), hogy megtudjuk, hogy hány működőképes pórus áll a rendelkezésünkre. Mindkét ellenőrzés sikeres volt, a készülék rendben működött, a Flongle flow cell-en pedig 74 pórus volt működőképes (126 pórusból). A szekvenálás végül hat órán keresztül futott, azonban így is elég adat keletkezett. A szekvenálás elejétől kezdve a rendszer nyomon követte az aktív pórusok számát, mely a folyamat elején 60% volt, majd folyamatosan csökkent, de végig 30% fölött mozgott (12. ábra).



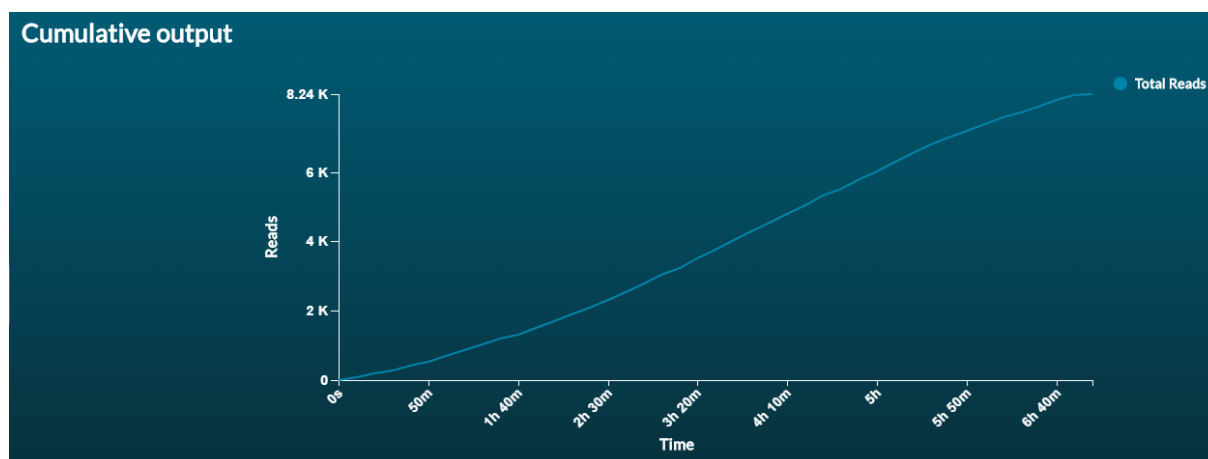
12. ábra Aktív pórusok száma (%) a szekvenálás ideje alatt

A pórusok mellett az eredményként kapott szekvenciákról is kaptunk adatokat (13. ábra). Láthatóan sokkal több 11-15 kb közötti readet kaptunk, mint rövideket, ami a restriktációs emésztés sikerességét mutatja. A legtöbb szekvencia 12,5-13,5 kb közötti méretű volt, ami megfelelt a szekvenált plazmid hosszának.



13. ábra Readek hosszúsága

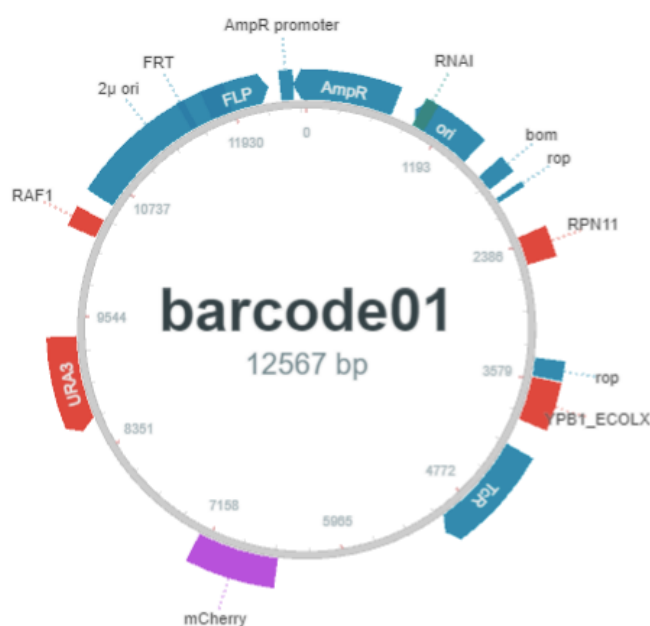
Valamint szintén fontos információ, hogy ugyan nem futott végig (24 óra) a szekvenálás, azalatt a 6 óra alatt is több, mint 8000 olvasat került szekvenálásra (14. ábra).



14. ábra Kapott adatok mennyisége az idő elteltével

5.6 A plazmid szekvenciájának összerakása az EPI2ME szoftverrel

A FAST5 fájlokból a basecallt a Guppy szoftver segítségével végeztük el. Ehhez Linux operációs rendszert használtunk, ahol a szoftver segítségével kaptuk meg azon FASTQ fájlokat, amikkel az EPI2ME (Windows) már tudott tovább dolgozni. Megkaptuk a pontos szekvenciáját a plazmidnak, valamint azt is, hogy hol helyezkednek el rajta a gének (15. ábra). A plazmid szekvenciájának pontos ismeretében már meg tudtuk tervezni a rDNS amplifikálásához szükséges primereket.



15. ábra Megszekvenált mRFP-t kódoló összerakott és annotált plazmid

5.7 A tervezett primerek a repair DNS amplifikálásához

A rDNS amplifikálásához primereket terveztünk az összerakott plazmidra. A tervezést a Benchling online szoftver segítségével végeztük el (<https://benchling.com/>). A forward (FWD) és reverse (REV) primereket is egyaránt 80 bázis hosszúságúra terveztük, melyek 3' végétől számítva 20 bázis képes bekötődni az RFP gén promóter, illetve terminátor régiójához. A primerek 5' végén 60 bázis hosszú túlnyúló szakasz van, mely az általunk kiválasztott δ -szekvencia megfelelő szakaszaival homológ. Emiatt a PCR termék (rDNS) képes lesz beépülni a genomba homológ rekombináción keresztül. A homológ szakaszok a gRNS, és a PAM szekvenciától upstream, illetve downstream helyezkednek el (3. táblázat).

3. táblázat Tervezett primerek a rDNS amplifikálásához

guide1_mCherryrepF	5'- GATTTTGATGTAATTGTTGGGATTCCATTGTGATTAAGGCTATA ATATTAGGTATGTAGACGCACAGTTACAATTGTAGAGG-3'
guide1_mCherryrepR	5'- TGATAATAATATTTATAGAATTGTGTAGAATTGCAGATTCCCTT TTATGGATTCCTAAATAAAAAAACCATGAGATTGAT-3'
guide2_mCherryrepF	5'- AGTATATTATCATATACGGTGTTAGAAGATGACGCAAATGATG AGAAATAGTCATCTAAA CGCACAGTTACAATTGTAGAGG-3'
guide2_mCherryrepR	5'- ATAAATATTATTATCATCGTTTTATATGTTAATATTCATTGATCC TATTACATTATCAATAAAAAAACCATGAGATTGAT-3'

VI. Összefoglalás

A *S. 'boulardii'* probiotikus élesztőt, mely a *S. cerevisiae* altípusa (Imre és mtsai., 2019), a bél egészséges működésére, valamint gasztrointesztinális megbetegedések megelőzéséhez és kezeléséhez használják (McFarland és Bernasconi, 1993; Liu és mtsai., 2016). Terápiás szerként is javasolják, mivel belfertőzések esetén jótékony hatása van (Zanello és mtsai., 2009). Ez a probiotikus terápia általánosan biztonságosnak ítélt (GRAS), azonban az utóbbi években beszámoltak több, *S. 'boulardii'* által okozott fungémiáról (Cherifi, 2004; McFarland, 2006; Thygesen, 2012). Napjainkban már genetikailag módosított probiotikum törzsek is létrehozhatók, valamint elképzelhető, hogy a közel jövőben egyre több, úgynevezett designer probiotikum jelenik meg a piacon.

A munkánk alapját egy szabadalom képezi, melyben a *S. 'boulardii'*-t génmódosítás segítségével felhasználták humán immunoglobulinból származó antitest-alapú kötőanyagok konstitutív termeltetésére, valamint ezen kötőanyagok kiválasztására. A módosított törzseket úgy tervezték meg, hogy a kötőanyagokból minél többet termeljenek. Az általuk használt módszer a CRISPR/Cas9 volt. Emellett egy másik szakirodalomban leírtak egy olyan plazmidon kódolt színmarkert (mRFP), amelynek élesztőben történő expressziója lila színű telepeket eredményez. Ezen tulajdonság a plazmid fenntartásának gyors szűrését teszi lehetővé *S. cerevisiae* sejtekben (Keppler-Ross és mtsai., 2008). Ezen szabadalom és a lila színmarkergént leíró szakirodalom ötvözésével, megterveztünk egy törzset, mely a genomba integrálva hordozza az mRFP gént több kópiában.

Először megvizsgáltuk a vizsgált izolátumaink (PY0003, PY0004, 551/2018, DE27020, DE3912, DE42533, DE42807, DE45866) transzpozonkészletét, melynek eredményeképpen kiderült, hogy mind a nyolc izolátumban hasonló kópiában fordultak elő az egyes transzpozonok, a Ty2/5 transzpozonok több kópiában fordultak elő, a Ty1/3/4 transzpozonok nagyrészt hiányoztak. Ezt követően megterveztük a gRNS-eket, amelyek a Cas9 enzimmel komplexet képeznek, specifikus DNS kettős szál törést eredményezve a *S. 'boulardii'* genomban található δ -szekvenciákban. Ezeket a gRNS-eket a genomban leggyakrabban előforduló δ -szekvencia részletre terveztük. Golden Gate reakciók révén összeállítottunk egy olyan plazmidot, amely kódolja a Cas9 enzimet, a nourseothricin markergént, valamint a gRNS-t. Ezen felül megterveztük az mRFP-t kódoló kazetta amplifikálásához szükséges primereket is, mely folyamatot megelőzően egy Oxford Nanopore szekvenálás, így megtudtuk az mRFP-t kódoló plazmid teljes szekvenciáját, aminek köszönhetően már meg tudtuk tervezni a megfelelő primereket.

További munkáink közé tartozik a primerek megrendelése, majd pedig az mRFP kazetta amplifikálása és annak integrálása a Cas9/Markergén/gRNS kódoló plazmid segítségével a *S. 'boulardii'* genomjába.

Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőimnek Dr. Pfliegler Valter Péter adjunktusnak, és Imre Alexandra tudományos segédmunkatársnak a TDK dolgozatom elkészülésében adott szakmai segítségükért.

A munka megvalósulását a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal Fiatal Kutatói Pályázata (NKFIH FK138910), valamint az Új Nemzeti Kiválóság Program (ÚNKP-22-4-I-DE-293) támogatta.

Hivatkozások

- Akhmetov, A., Laurent, J. M., Gollihart, J., Gardner, E. C., Garga, R. K., Ellington, A. D., Kachroo, A., Marcotte, E. M. (2018): Single-step Precision Genome Editing in Yeast Using CRISPR-Cas9. *Bio. Protoc.* 8(6): e2765
- Blenchner, G., Bléhaut, H., Mentec, H., Moyse, D. (1997): *Saccharomyces boulardii* prevents diarrhea in critically ill tube-fed patients. A multicenter, randomized, double-blind placebo-controlled trial. *Intensive Care Med.* 23(5): 517-23
- Chakravarty, S., Parashar, A., Acharyya, S. (2019): *Saccharomyces cerevisiae* Sepsis Following Probiotic Therapy in an Infant. *Indian Pediatr.* 56(11):971-972
- Cherifi, S., Robberecht, J., Miendje, Y. (2004): *Saccharomyces cerevisiae* fungemia in an elderly patient with *Clostridium difficile* colitis. *Acta Clin Belg.* 59(4):223-4
- Dalmasso, G., Cottrez, F., Imbert, V., Lagadec, P., Peyron, JF, Rampal, P., Czerucka, D., Groux, H., Foussat, A., Brun, V. (2006): *Saccharomyces boulardii* inhibits inflammatory bowel disease by trapping T cells in mesenteric lymph nodes. *Gastroenterology.* 131(6):1812- 25
- Feng, H., Galen, J. E., Chen, K., Zhu, Y. (2018): Patent Application Publication. Pub. No.: US 2018/0319872 A1
- Goh, Y. J., Barrangoua, R. (2021): Portable CRISPR-Cas9^N System for Flexible Genome Engineering in *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus gasseri*, and *Lactobacillus paracasei*. *Appl Environ Microbiol.* 87(6): e02669-20
- Imre, A., Rácz, H. V., Antunovics, Zs., Rádai, Z., Kovács, R., Lopandic, K., Pócsi, I., Pfliegler (2019): A new, rapid multiplex PCR method identifies frequent probiotic origin among clinical *Saccharomyces* isolates. *Microbiol Res,* 227:126298
- Inoue, H., Nojima, H., Okayama, H., (1990): High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene.* 96, 23–28.
- Jeck, W. R., Jafrate, A. J., Nardi, V. (2021): Nanopore Flongle Sequencing as a Rapid, Single-Specimen Clinical Test for Fusion Detection. *J Mol Diagn.* 2021, 23: 630-636
- Jing-Jing Liu, Kong, I. I., Guo-Chang Zhang, Jayakody, L. N., Kim, H., Peng-Fie Xia, Kwak, S., Sung, B. H., Jung-Hoon Sohn, Walukiewicz, H. E., Rao, C. V., Yong-Su Jin (2016): Metabolic Engineering of Probiotic *Saccharomyces boulardii*. *Appl Environ Microbiol.* 82(8): 2280-2287
- Keppler-Ross, S., Noffz, C., Dean, N. (2008): A New Purple Fluorescent Color Marker for Genetic Studies in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Genetics.* 179(1):705-710
- Khatri, I., Tomar, R., Ganesan, K., Prasad, G. S., Subramanian, S. (2017): Complete genome sequence and comparative genomics of the probiotic yeast *Saccharomyces boulardii*. *Sci Rep.* 23;7(1):371

Lee, M. E., Deloache, W. C., Cervantes, B., Dueber, J. E. (2015): A highly characterized yeast toolkit for modular, multipart assembly. *ACS Synth. Biol.* 4, 975–986.

Ma, Y., Zhang, L., Huang, X. (2014): Genome modification by CRISPR/Cas9. *FEBS J.* 281(23):5186-93

McFarland, L. V. (2006): Meta-analysis of probiotics for the prevention of antibiotic associated diarrhea and the treatment is *Clostridium difficile* disease. *Am J Gastroenterol.* 101(4):812-22

McFarland, L. V., Bernasconi, P. (1993): *Saccharomyces boulardii*: A Review of an Innovative Biotherapeutic Agent. Microbial ecology in health and disease. *Microbiol Ec H Dis.* 6: 157-171 (1993)

Mumy, K. L., Chen, X., Kelly, C. P., McCormick, B. A. (2008): *Saccharomyces boulardii* interferes with Shigella pathogenesis by postinvasion signaling events. *Am J Physiol Gastroentest Liver Physiol.* 294(3): G599-G609

Pais, P., Almeida, V., Yilmaz, M., Teixeira, M. C. (2020): *Saccharomyces boulardii*: What Makes It Tick as Successful Probiotic? *J. Fungi (Basel).* 6(2):78

Plaza-Diaz, J., Ruiz-Odeja, F. J., Gil-Campos, M., Gil, A. (2019): Mechanisms of Action of Probiotics. *Adv. in Nutr.* 10: S49-S66

Poncelet, A., Ruelle, L., Konopnicki, D., Miendje Deyi, V. Y., Dauby, N. (2021): *Saccharomyces cerevisiae* fungemia: Risk factors, outcome and links with *S. boulardii*-contamination probiotic administration. *Infect Dis Now.* 51(3):293-295

Pozzoni, P., Riva, A., Bellatorre, A. G., Amigoni, M., Redaelli, E., Ronchetti, A., Stefani, M., Tironi, R., Molteni, E. E., Conte, D., Casazza, G., Colli, A. (2012): *Saccharomyces boulardii* for the prevention of antibiotic-associated diarrhea in adult hospitalized patients: a single-center, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Am J Gastroenterol.* 107(6): 922-31

Roman, H (1956): Studies of gene mutation in *Saccharomyces*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 21:175-85

Thygesen, J. B., Glerup, H., Tarp, B. (2012): *Saccharomyces boulardii* fungemia caused by treatment with a probioticum. *BMJ Case Rep.* 2012: bcr0620114412

Vandeputte, D. (2020): Personalized Nutrition Through The Gut Microbiota: Current Insights And Future Perspectives. *Nutr. Rev.* 78(12 Suppl 2):66-74

Ventoulis, I., Salmourli, T., Amoiridou, P., Mantzana, P., Exindari, M., Gioula, G., Vyzantiadis, T. A. (2020): Bloodstream Infection by *Saccharomyces cerevisiae* in Two COVID-19 Patients after Receiving Supplementation of *Saccharomyces* in the ICU. *J. Fungi.* 6(3), 98

W. P. (2019): A new, rapid multiplex PCR method identifies frequent probiotic origin among clinical *Saccharomyces* isolates. *Microbiol Res.* 227: 126298

Wombwell, E., Bransteitter, B., Gillen, L. R. (2021): Incident of *Saccharomyces cerevisiae* fungemia in hospitalised patients administrated *Saccharomyces boulardii* probiotic. doi:10.1111/MYC.13375

Wu, Z., Che, Y., Dang, C., Zhang, M., Zhang, X., Sun, Y., Li, X., Zhang, T., Xia, Y. (2022): Nanopore-based long-read metagenomics uncover the resistome intrusion by antibiotic resistant bacteria from treated wastewater in receiving water body. *Water Research*. 226 (2022) 119282

Zanello, G., Meurens, F., Berri, M., Salmon, H. (2009): *Saccharomyces boulardii* effects on gastrointestinal diseases. *Curr. Issues Mol. Biol.* 11: 47-58