

Семен Буряченко

Молекулярная генетика дрожжей сахаромицетов

LAP **LAMBERT**
Academic Publishing

С. В. Буряченко

**МОЛЕКУЛЯРНАЯ ГЕНЕТИКА
ДРОЖЖЕЙ САХАРОМИЦЕТОВ**

Буряченко Семен Васильевич

**МОЛЕКУЛЯРНАЯ ГЕНЕТИКА
ДРОЖЖЕЙ САХАРОМИЦЕТОВ**

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие	5
1. ВВЕДЕНИЕ. ДРОЖЖИ КАК МОДЕЛЬНЫЕ ЭУКАРИОТЫ 8	
2. РАЗМНОЖЕНИЕ И ЖИЗНЕННЫЕ ЦИКЛЫ ДРОЖЖЕЙ САХАРОМИЦЕТОВ..9	
3. ГЕНОМ ДРОЖЖЕЙ.....15	
4. ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ДРОЖЖЕЙ.....20	
4.1. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ НОМЕНКЛАТУРА.....21	
4.2. ОСНОВНЫЕ МЕТОДЫ ГЕНЕТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА	25
4.3. ТРАНСФОРМАЦИЯ У ДРОЖЖЕЙ	27
4.4. ВЕКТОРЫ ДРОЖЖЕЙ	28
4.4.1. Векторы YPr	30
4.4.2. Векторы YEp	33
4.4.3. Векторы YCp	34
4.5. ГЕНЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ В ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАНИПУЛЯЦИЯХ И ИССЛЕДОВАНИЯХ.	35
4.5.1. Гены URA3 и LYS2	37
4.5.2. Гены ADE1 и ADE2.	38
4.5.3. Промотор GAL1	40
4.5.3. <i>lacZ</i> и другие репортерные гены	42
4.6. МАНИПУЛИРОВАНИЕ ГЕНОМOM IN VITRO С ПОМОЩЬЮ ПЛАЗМИД	44
4.6.1. Клонирование по комплементации	45
4.6.2. Мутагенез <i>in vitro</i>	47
4.6.3. Извлечение мутантных аллелей	49
4.6.4. Двухэтапное замещение гена	50
4.6.5. Разрушение гена и одноэтапное замещение гена	55
4.6.6. Тасование плазмид	59
5. ДРОЖЖИ КАК СТАНДАРТНАЯ АНАЛИТИЧЕСКАЯ СИСТЕМА 55	
5.1. ДИГИБРИДНАЯ СИСТЕМА	55
5.2. ИСКУССТВЕННЫЕ ХРОСОМОМЫ ДРОЖЖЕЙ	59
5.3. ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ ГЕТЕРОЛОГИЧНЫХ БЕЛКОВ В КЛЕТКАХ ДРОЖЖЕЙ	64
Заключение	66
Выводы.....	70
Литература.....	72

В монографии отражен современный уровень знаний по генетике дрожжей. Изложены общие вопросы генетики и биотехнологии как науки и промышленной отрасли – генетика, популяции дрожжей, специфика и возможности различных биотехнологических процессов; охарактеризованы биологические агенты, субстраты и получаемые целевые продукты. Даны процессы получения белка одноклеточных, аминокислот, органических кислот, биополимеров с применением генетических манипуляций. Рассмотрены новейшие методы биотехнологии дрожжей – инженерная энзимология, клеточная и генетическая инженерия. Книга предназначена для студентов, аспирантов, научных работников и специалистов – микробиологов, биотехнологов, биохимиков, экологов.

Табл. 7. Илл. 11. Библиогр.: 72 назв.

ПРЕДИСЛОВИЕ

*Посвящаю эту книгу моей жене, брату
и сотрудникам по работе*

Начало первых генетических исследований на дрожжах относится к открытию радиационного мутагенеза Г. А. Надсоном и С. Г. Филипповым в 1925 г. заложило основы радиобиологии и стимулировало исследования по генетике дрожжей. Они касались доказательств существования чередования поколений в жизненном цикле дрожжей с изменением ploидности. Было показано, что аскоспоры *Saccharomyces cerevisiae* гаплоидны, и конъюгация спор или их потомков приводит к восстановлению диплоидного состояния, характерного для вегетативной стадии сахаромецетов. О. Винге разработал метод тетрадного анализа с изоляцией 4 спор аска с помощью микроманипулятора. Впоследствии дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* оказались прекрасным модельным объектом для генетических исследований, и со времени этих работ генетика дрожжей развивалась очень бурно. Были выполнены тысячи работ как теоретического, так и прикладного характера, касающиеся конструирования генетически измененных штаммов дрожжей для биотехнологической промышленности.

Вторая половина XX в. отличается еще большей дифференциацией разделов зимологии, выделением новых направлений. Возникают функциональная морфология и цитология дрожжей (В. И. Бирюзова в СССР, Матиль в Швейцарии, Е. Штрейблова в Чехословакии), молекулярная генетика и генетическая систематика (работы японских, американских, канадских ученых, в СССР - исследования Г. И. Наумова), морская зимология (А. Е. Крисс, М. И. Новожилова в СССР), экология и закономерности распределения дрожжей

Появляются новые отрасли на стыке разных направлений, растут запросы и потребности биотехнологии, широко использующей дрожжевые организмы в самых разных производствах. Дрожжи все больше вовлекаются в работы по созданию векторных систем для получения ценных продуктов биологического синтеза. Дрожжи представляют собой гибкую и быструю генетическую систему для изучения клеточных процессов. При времени клеточной генерации около 90 мин. всего за два дня можно вырастить колонии, содержащие миллионы клеток. К тому же дрожжи можно поддерживать в гаплоидной и диплоидной формах, что резко упрощает их генетический анализ. Как и бактерий, гаплоидные клетки дрожжей можно использовать для получения ауксотрофных мутантов со специфическими требованиями к составу питательной среды. Рecessивные летальные мутации можно поддерживать в культуре гаплоидных клеток в виде условных летальных аллелей (например, температурочувствительных мутантов) или в культуре гетерозиготных диплоидных клеток (содержащих и аллель дикого типа и мутацию). Наличие высокоэффективной системы гомологичной рекомбинации у дрожжей позволяет произвольно изменять любую выбранную хромосомную последовательность ДНК. К тому же, можно осуществлять манипуляции с участками хромосом в составе рекомбинантных плазмид, которые стабильно поддерживаются в делящихся клетках дрожжей, благодаря включению в них коротких последовательностей центromеры и ori репликации ДНК. В дрожжах стабильно поддерживаются даже линейные плазмиды (минихромосомы), содержащие теломерные повторы по концам. Вместе с описанными генетическими подходами к протеазо-дефицитным штаммам, растущим в синхронных и асинхронных крупномасштабных культурах, вполне применимы биохимические методы. В последние годы арсенал доступных средств расширился изощренными методами анализа с помощью микрочипов и белковых сетей, легко охватывающих весь небольшой геном дрожжей. Эти методы позволяют осуществлять полногеномный анализ транскрипции,

связывания факторов транскрипции, модификации гистонов и белок-белковых взаимодействий. Такой широкий арсенал изощренных методов позволил ученым исследовать механизмы регуляции формирования гетерохроматина и его физиологическую роль в клетках дрожжей. В 1997 году был полностью расшифрован геном *Saccharomyces cerevisiae*, что открывает огромные перспективы геномики дрожжей, новые горизонты их биотехнологического использования. Таким образом, наука о дрожжах, проделав более чем полуторавековой путь, продолжает интенсивно развиваться и в XXI веке.

кандидат биологических наук С. В. Буряченко

1. Введение. Дрожжи как модельные эукариоты

Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* являются эукариотическими микроорганизмами, генетически более сложными, нежели бактерии. Клетка дрожжей, по сравнению с клеткой кишечной палочки *Escherichia coli*, содержит в 3,5 раза больше ДНК. Вместе с тем, в качестве экспериментального объекта дрожжи обладают многими из технических преимуществ, обеспечивших быстрый прогресс молекулярной генетики прокариот и их вирусов. В этой связи следует упомянуть их способность быстро размножаться, возможность манипулирования отдельными клетками дрожжей, легкость одновременного переноса множественных культур дрожжей на селективные среды и выделения мутантов, детальную изученность дрожжей как генетической системы и, что, может быть, важнее всего, возможность разностороннего использования системы генетической трансформации дрожжей. В отличие от многих микроорганизмов клетки дрожжей могут сохранять жизнеспособность при наличии в их геноме множественных генетических маркеров. Дрожжи не патогенны, поэтому работа с ними не требует чрезвычайных мер предосторожности [1, с. 111-123].

Опять-таки в отличие от многих видов микроорганизмов, у дрожжей сахаромицетов стабильны как гаплоидное, так и диплоидное состояния. Благодаря этому, с одной стороны, легко изолировать рецессивные мутации, которые обеспечивают мутантный фенотип у гаплоидных штаммов, и, с другой стороны, можно использовать диплоиды для проведения теста на комплементацию [2, с. 83-84].

Разработка системы генетической трансформации дрожжей дала в руки исследователям замечательный инструмент клонирования генов и генетической инженерии; на этой основе разработаны методы, эффективно применяемые для анализа генной регуляции, взаимосвязи между структурой и функцией белков,

структуры хромосом и других важных вопросов биологии клетки [3, с. 231-247].

Кроме того, дрожжи сыграли и продолжают играть существенную роль в изучении других организмов. Так, дигибридная система используется как общий инструмент для обнаружения белок-белковых взаимодействий; искусственные хромосомы дрожжей (YAC) нашли широкое применение для клонирования протяженных фрагментов ДНК, системы экспрессии в клетках дрожжей используются для получения гетерологичных белков в лабораторных и коммерческих целях [4, с. 69-72].

2. Размножение и жизненные циклы дрожжей сахаромицетов

Характерная особенность клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* состоит в том, что их вегетативное размножение происходит посредством почкования. Началом образования дочерней клетки служит появление выроста на материнской клетке, далее происходят деление ядра, образование клеточной стенки и, в конце концов, разделение клеток. Материнская клетка обычно образует не более 20-30 почек, возраст материнской клетки можно определить по числу шрамов от почкования, остающихся на клеточной стенке (рис. 1). Размеры гаплоидных и диплоидных клеток варьируют для разных штаммов и разных условий размножения. Типичные диплоидные клетки представляют собой эллипсоиды размером 5 x 6 мкм, типичные гаплоидные клетки - это сфероиды с диаметром 4 мкм [5, с. 560-571]. Общие данные о величине и химическом составе клеток дрожжей приведены в Табл. 1.

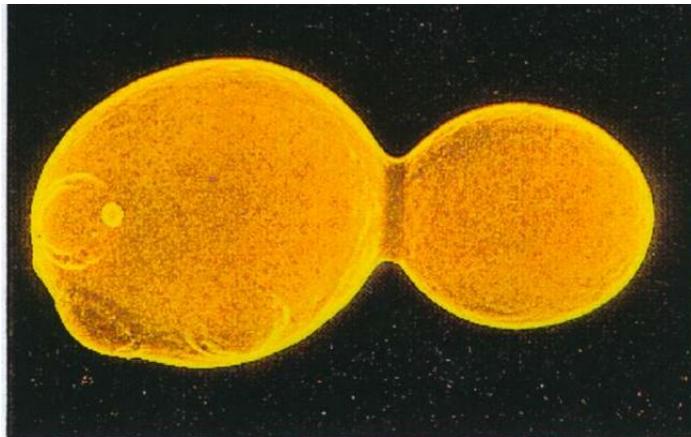


Рис. 1. Клетки *Saccharomyces cerevisiae*

Вверху: так выглядят дрожжевые клетки, активно размножающиеся почкованием;
внизу: отдельная пара материнской (более крупная) и дочерней клеток; на поверхности материнской клетки заметны «шрамы» от предыдущих почкований.

Таблица 1. Объем и состав клеток дрожжей

Характеристика	Гаплоидная клетка	Диплоидная клетка
Объем (мкм ³)	70	120
Состав (пг)		
Сырая масса	60	80
Сухая масса	15	20
ДНК	0,017	0,034
РНК	1,2	1,9
Белок	6	8

Для выращивания культур дрожжей оптимальная температура составляет 30°C. Стандартная полноценная питательная среда называется YEPD и состоит, помимо воды, из дрожжевого экстракта, пептона и глюкозы. Для культур нормальных гаплоидных клеток дрожжей, экспоненциально растущих при оптимальной температуре в среде YEPD, период генерации, т.е. время, за которое численность клеток удваивается, составляет около 90 мин. При выращивании культуры в синтетической среде (т.е. без дрожжевого экстракта и пептона, но с источником азота, минеральными солями, витаминами и микроэлементами) период генерации нормальных клеток увеличивается примерно до 140 мин; у многих мутантных штаммов скорость роста на синтетических средах гораздо ниже. При культивировании в YEPD максимальная плотность культуры составляет обычно 2×10^8 клеток/мл, но при использовании специальных приемов может быть повышена еще на порядок. Максимальная плотность культур, выращенных в синтетической среде, составляет обычно около 10^7 клеток/мл [6, с. 144].

Штаммы дрожжей сахаромицетов бывают гомоталличные и гетероталличные. Жизненный цикл гетероталличных дрожжей представлен на рис. 2. В условиях нехватки питательных веществ диплоидные клетки спорулируют. В лабораториях в качестве споруляционной среды часто используется агаризованный раствор ацетата калия. Во время споруляции диплоидная клетка претерпевает мейоз и дает начало четырем гаплоидным потомкам, которые в виде спор, именуемых в данном случае аскоспорами,

инкапсулируются в мешкообразную структуру, которая называется аском. Эффективность споруляции широко варьирует в зависимости от штаммов и может быть очень близка как к 0, так и к 100%. Для многих лабораторных штаммов эта эффективность выше 50%. Нормальный аск содержит, как уже было сказано 4 аскоспоры, но, как правило, в спорулирующей культуре присутствуют также аски с тремя и меньшим количеством спор [7, с. 1364-1370].

У дрожжей имеются два пола, или типа спаривания. Один пол называется a , другой - α . Пол генетически контролируется парой аллелей локуса типа спаривания, которые называются $MATa$ и $MAT\alpha$. Кроме того, существуют бесполое клетки. Это, например, диплоиды, гетерозиготные по локусу типа спаривания, т.е. несущие одновременно оба аллеля, $MATa$ и $MAT\alpha$. Эти бесполое клетки, как уже сказано, способны спорулировать. Поскольку они гетерозиготны по локусу типа спаривания, из четырех спор, присутствующих в аске, две несут аллель $MATa$ и две -аллель $MAT\alpha$. При переносе аска на питательную среду

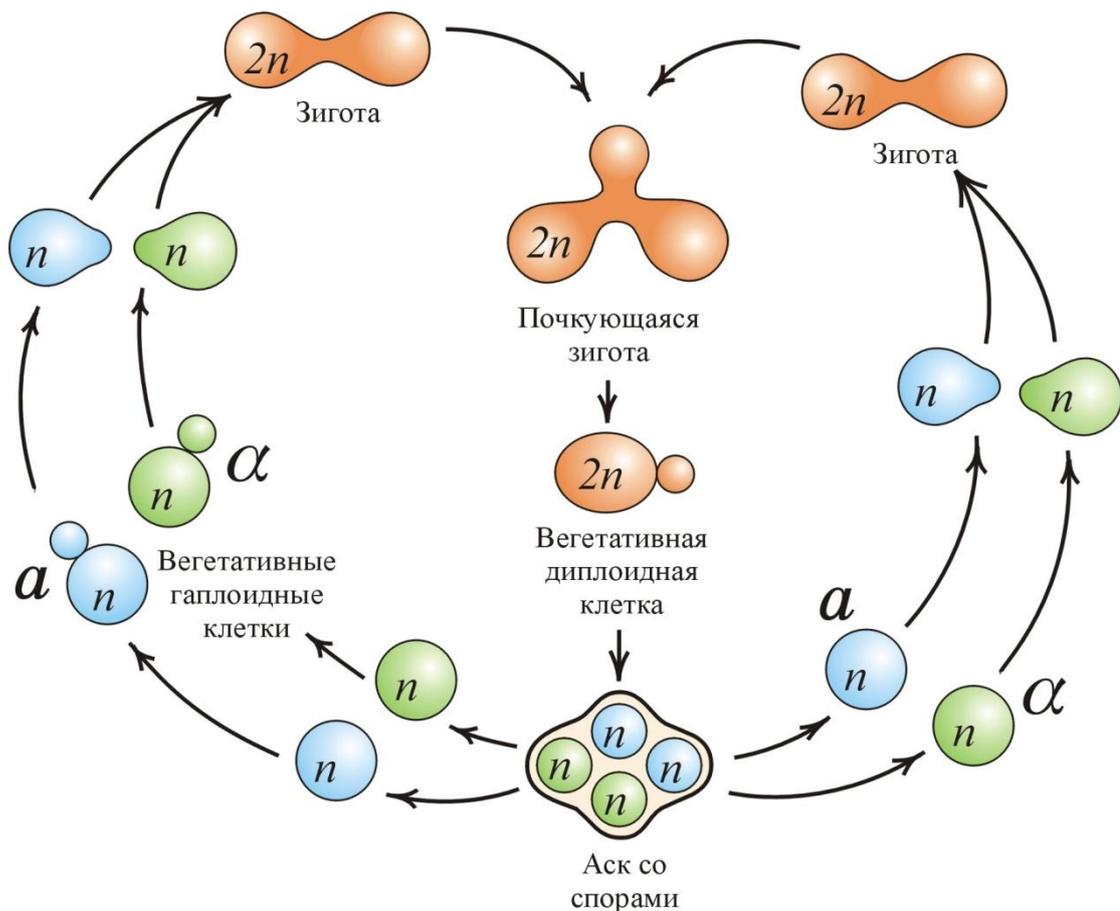


Рис. 2. Жизненный цикл дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*.

Гаплоидная клетка содержит набор из n различных хромосом, у диплоидов каждая хромосома гаплоидного набора представлена двумя гомологами ($2n$). Индивидуальные гаплоидные клетки обладают типом спаривания, или полом; полов у них два – a и α . Зиготы образуются при слиянии клеток противоположного пола.

происходит прорастание спор и начинается вегетативное размножение клеток обоего пола, которые могут спариваться друг с другом. Если отдельную аскоспору из аска гетероталличных дрожжей изолировать и поместить в условия, способствующие размножению, то ее потомство будет состоять из клеток одного и того же типа спаривания. и называться оно будет моноспоровый клон или штамм. Гомоталлические штаммы отличаются от гетероталлических наличием гена НО. Этот ген обеспечивает переключение типов спаривания у размножающихся гаплоидных клеток, так что клетки, имеющие пол a , образуют почки, имеющие пол α , а клетки, имеющие пол α , образуют почки, имеющие пол a . Легко понять что в гомоталлических моноспоровых клонах будут присутствовать клетки обоего пола, и они будут спариваться с образованием диплоидных клеток. Вскоре весь клон будет состоять из диплоидных клеток, так что гаплофаза у гомоталлических штаммов является преходящей и краткосрочной [8, с. 291-297].

Надо отметить, что дрожжи, наряду с мухой дрозофилой, на протяжении уже многих десятилетий представляют собой излюбленный объект генетических исследований. Объектом классического генетического анализа служит постмейотическое потомство гибридов исследуемых штаммов. Для получения гибридов разных штаммов дрожжей клетки исходных штаммов смешивают друг с другом на полноценной питательной среде и инкубируют в течение нескольких часов. Если скрещиваемые штаммы несут, комплементарные генетические маркеры (например, клетки одного из них не размножаются на среде без триптофана, а клетки другого штамма нуждаются в гистидине), то на подходящей селективной синтетической среде можно отобрать прототрофные диплоидные колонии. Если же диплоиды, получаемые в скрещивании, не обладают селективными преимуществами, тогда можно с помощью микроманипулятора изолировать из смеси клеток индивидуальные зиготы, из которых затем вырастут диплоидные колонии. Зиготы имеют характерную форму гантелей или трилистников [9, с. 15-17].

3. Геном дрожжей

Веществом генома дрожжей, как и геномов прочих организмов, являются нуклеиновые кислоты. В таблице 2 приведены данные, характеризующие состав генома дрожжей. Он включает в себя 4 основных вида ядерных и цитоплазматических генетических детерминантов, состоящих как из ДНК, так и из РНК. Три вида детерминантов будут нами рассмотрены вкратце, а на четвертом остановимся подробнее [10, с. 427].

Во-первых, почти во всех штаммах *S. cerevisiae* присутствуют вирусы, содержащие днРНК, на долю которых приходится приблизительно 0,1% тотальной массы нуклеиновых кислот. Строго говоря, имеются три семейства РНК-содержащих вирусов, которые содержат днРНК L-A, L-BC и M; еще два вида днРНК, T и W, реплицируются в клетках дрожжей, но как будто пока не показано, что они представляют собой вирусные РНК. ДнРНК M кодирует токсин, а L-A кодирует главный белок оболочки и компоненты, необходимые для репликации вирусов и поддержания M. Два вида днРНК, M и L-A, упаковываются по отдельности в общий капсидный белок, кодируемый L-A; в результате получаются вирусоподобные частицы, переносимые через цитоплазму во время вегетативного размножения и конъюгации. L-B и L-C, (обозначаемые совместно L-BC), подобно L-A, кодируют РНК-зависимую РНК-полимеразу и присутствуют во внутриклеточных частицах. Мутанты *KIL-0*, лишенные днРНК M и не вырабатывающие киллер-токсин, легко могут быть индуцированы химическими и физическими агентами, а также выращиванием культур при повышенной температуре [11, с. 558].

Таблица 2. Общая структура генома дрожжей

Наследование	Менделевское	Неменделевское		
Нуклеиновые кислоты	Двунитевые ДНК			Двунитевые РНК
Локализация	Ядро		Цитоплазма	
Генетические детерминанты	Хромосомы	2 мкм плаزمида	Митохондриальная ДНК	РНК-содержащие вирусы
Относительное количество	85%	5%	10%	L-A 80% M 10% L-BC 9% T 0,5% W 0,5%
Число копий	2 комплекта по 16	60-100	~50 (8 -130)	103 170 150 10 10
Размер (т.п.н.)	13392 (230-2352)	6,318	70-76	4,576 1,8 4,6 2,7 2.25
Дефекты мутантов	Разнообразные	Не обнаружены	По цитохромам aa_3 и b	По киллер-токсину
Обозначение для нормального состояния (дикий тип)	$YFG1^+$	cir^+	ρ^+ (rho^+)	$KIL-k_1$
Обозначение для мутантов или вариантов	$yfg1-1$	cir^0	ρ^- (rho^-)	$KIL-0$

Следующий компонент генома, митохондриальная ДНК, кодирует компоненты аппарата митохондриальной трансляции и приблизительно 15% митохондриальных белков. Мутанты ρ^0 полностью лишены митохондриальной ДНК и дефектны по дыхательным полипептидам, синтезируемым на митохондриальных рибосомах, т.е. по цитохрому b и субъединицам цитохромоксидазного и АТФазного комплексов. Хотя мутанты ρ^0 дефектны по дыханию, они жизнеспособны и еще сохраняют митохондрии, которые, однако, морфологически аномальны [12, с. 130-136].

Третьим компонентом генома является кольцевая 2 мкм плазмида, которая обнаруживается у большинства штаммов дрожжей и функционирует, по-видимому, лишь для обеспечения собственной репликации. В общем случае штаммы cir^0 не отличаются от штаммов cir^+ фенотипически. Однако

определенная хромосомная мутация *nib1* замедляет размножение штаммов *cir*⁺ вследствие аномального увеличения числа копий плазмиды [13, с. 1794-1798].

Теперь можно перейти к четвертому и главному компоненту генома - хромосомам. Гаплоидный набор *S. cerevisiae* содержит 16 хорошо охарактеризованных хромосом, размер которых варьирует от 230 до 2352 т.п.н. О расшифровке полной последовательности хромосомной ДНК дрожжей длиной 12069 т.п.н. было сообщено в апреле 1996 г. В выполнении этого проекта “Геном дрожжей” принимали участие свыше 600 ученых из 96 лабораторий восьми стран. Идентифицированы 6340 открытых рамок считывания (ОРС) длиной не менее 100 кодонов. Сведения о структуре ядерного генома дрожжей даны в табл. 3. Из этой таблицы видно, в частности, что приблизительно 140 тандемно повторяющихся копий одной и той же последовательности в хромосоме XII кодируют рибосомную ДНК, а тРНК кодируют 275 генов. Гены тРНК диспергированы по всем 16 хромосомам. 80 из них содержат интроны. На долю повторяющихся последовательностей приходится около 10% генома дрожжей. Хромосомы содержат также подвижные элементы ДНК, ретротранспозоны, численность которых варьирует у разных штаммов [14, с. 754-757].

Таблица 3. Структура ядерного генома дрожжей

Хромосома	Общая длина (т.п.н.)	Размер повторов (т.п.н.)	Тип повторов	Число ОРС	Гены тРНК	Гены мяРНК
**	230	-	-	107	4	1
II	813	-	-	429	13	3
III	315	-	-	174	10	4
IV	1554	8+14	2(ENA2)+ 2(Y')	825	28	3
V	577	-	-	296	20	6
VI	270	-	-	135	10	0
VII	1091	-	-	575	36	7
VIII	589	26	13(CUP1)	292	11	2
IX	440	-	-	233	10	2
X	745	-	-	390	24	6
XI	666	-	-	336	16	4
XII	2352	1260+14	140(рДНК+ 2(Y'))	554	21	8
XIII	924	-	-	493	21	10
XIV	784	-	-	423	14	6
XV	1091	-	-	576	20	12
XVI	948	-	-	502	17	6
Всего	13392	1323	-	6340	275	80

Характеристики совокупности последовательностей ядерного генома дрожжей по состоянию знаний на 2000 год даны в табл. 4. Было предсказано, что примерно 5800 из 6340 идентифицированных ОРС (около 92%) соответствуют реальным генам, кодирующим белки. В отличие от геномов многоклеточных организмов геном дрожжей весьма компактен - ОРС занимают около 70% всего генома. Размер ОРС дрожжей варьирует от 40 до 4910 кодонов при среднем ее размере 483 кодона или 1,45 т.п.н. Средние размеры 5'- и 3'-фланкирующих последовательностей составляют, соответственно 309 и 163 п.н., что вместе с размером кодирующей последовательности дает средний размер гена дрожжей 1922 п.н. Примерно 3,5% ОРС дрожжей содержат интроны [15, с. 1253-1255].

Таблица 4. Состав последовательностей генома дрожжей

Кодируемые продукты	Общее число последовательностей	Средний размер последовательности (п.н.)	Доля последовательностей данного типа в геноме (%)
Белки			
Всего ОРС	6340	1450	68,64
Интроны	225	500	0,84
РНК			
рРНК	140	9000	9,41
тРНК	275	80	0,16
мяРНК	80	500	0,30
Мобильные элементы			
Ту1-Ту5	53	5900	2,20
Хромосомные элементы			
ARS	750	20	0,11
CEN	16	95	0,01
Субтеломерные повторы			
типа (Y')	21	5800	0,92
типа(X)	31	400	0,09
Теломерные повторы (C ₁₋₃ A)	32	300	0,07
Межгенные районы	~4600	500	17,25

Таблица 5. Количество открытых рамок считывания, кодирующих белки разных типов

Тип кодируемого белка	Число ОРС	Доля среди всех ОРС
Белки с известными функциями	3199	50,3
Белки, имеющие гомологов с известными функциями у других организмов	248	3,9
Белки, обнаруживающие слабую гомологию с другими белками	869	13,7
Белки, имеющие гомологов с неизвестными функциями	789	12,4
Белки, не имеющие гомологов	805	12,7
Сомнительные ОРС	447	7,0

В таблице 5 приведены численности ОРС, кодирующих различные типы белков, опять таки по данным на 2000 год. В то время были известны лишь функции половины кодируемых белков. Заметим, что в 1996 г. относительно 30-35% ОРС было известно, что они кодируют белки, которые имеют гомологов с неизвестными функциями или вообще не имеют гомологов. К 2000 г. доля таких ОРС уменьшилась до 25%. Точная оценка числа таких последовательностей невозможна, поскольку она зависит от используемого метода сравнения; кроме того, данные постоянно изменяются по мере секвенирования других геномов. Все же доля ОРС с неизвестными функциями весьма значительна. В связи с этим возникло новое направление исследований - определение функций новых генов. Проект получил название EUROFAN и явился закономерным продолжением проекта секвенирования генома дрожжей [16, с. 185-195].

4. Генетический анализ дрожжей

4.1. Генетическая номенклатура

В этом параграфе мы ограничимся рассмотрением генетической номенклатуры для хромосомных генов *S. cerevisiae*, которая вместе с разъяснениями сведена в таблице 6.

Кроме того, для обозначения генов, обнаруженных при систематическом секвенировании генома используется общая форма YCRXXw. Y - первая буква слова yeast (дрожжи); C (или A, B и т.д.) - обозначает хромосому III (или I, II и т.д.); R (или L) обозначает правое (или левое) плечо хромосомы; XX обозначает относительное положение начала открытой рамки считывания по отношению к центromере, и w (или c) обозначает уотсоновскую или криковскую нить хромосомной ДНК. Например, YCR5c обозначает расположенную в правом

плече хромосомы III в криковской нити пятую от центромеры открытую рамку считывания [17, с. 281-283].

4.2. Основные методы генетического анализа

Для выделения и определения характеристик мутаций у дрожжей используются разнообразные подходы. В общем случае клетки гаплоидного штамма обрабатывают мутагеном, например этилметансульфонатом, и посредством одной или нескольких процедур обнаруживают желаемые мутанты. Дальше часто будет фигурировать трехбуквенный символ Yfg с номером или без номера. Это общее условное обозначение того или иного исследуемого гена, которое образовано первыми буквами слов *your favourite gene*. Например если фенотипу Yfg^- соответствует ауксотрофность по определенному метаболиту, например, по аргинину, или температурочувствительность, т.е. неспособность размножаться при 37°C, мутанты можно обнаруживать с помощью метода отпечатков, когда культуры клеток переносятся параллельно на полноценную и селективную среды. Идентифицированные мутанты Yfg^- можно анализировать, используя разнообразные методы генетики и молекулярной биологии. Рисунок 3 иллюстрирует три главных метода: тест на комплементацию, мейотический анализ и молекулярное клонирование [18, с. 410-414].

Для анализа генетической комплементации мутант $Yfg^- MAT\alpha$ скрещивают с каждым из тестерных штаммов $MAT\alpha yfg1$, $MAT\alpha yfg2$ и т.д., а также, в качестве контроля, с нормальным штаммом $MAT\alpha$. Мутации $yfg1$, $yfg2$ и пр. определяют один и тот же фенотип, но не аллельны друг другу, т.е. затрагивают разные гены. Изолируют диплоиды, получившиеся при скрещивании, и анализируют их фенотип, т.е. признак Yfg . Если гетерозиготные диплоиды имеют фенотип Yfg^+ , то анализируемая мутация yfg рецессивна. Поскольку, как видно на рисунке, скрещивание анализируемого

мутанта с тестером *MATα yfg1* дает фенотип Yfg^- , а скрещивания с *MATα yfg2*, *MATα yfg3* и пр. дают фенотип Yfg^+ , тест на комплементацию показывает, что исходный мутант несет мутацию *yfg1*.

Таблица 6. Генетическая номенклатура на примере ARG2

Символ	Значение символа
<i>ARG</i> ⁺	Наличие нормальных аллелей всех генов, контролирующих потребность в аргинине
<i>ARG2</i>	Лocus или доминантный аллель
<i>arg2</i>	Лocus или рецессивный аллель, вызывающий у клеток потребность в аргинине
<i>ARG2</i> ⁺	Аллель дикого типа
<i>arg2-9</i>	Специфический мутантный аллель
<i>Arg</i> ⁺	Штамм, не нуждающийся в аргинине
<i>Arg2p</i>	Белок, кодируемый <i>ARG2</i>
<i>arg2-Δ1</i>	Специфическая полная или частичная делеция <i>ARG2</i>
<i>ARG2::LEU2</i>	Встраивание функционального гена <i>LEU2</i> в locus <i>ARG2</i> , при котором <i>ARG2</i> остается функциональным и доминантным
<i>arg2::LEU2</i>	Встраивание функционального гена <i>LEU2</i> в locus <i>ARG2</i> , при этом <i>arg2</i> нефункционален или становится нефункциональным
<i>arg2-10::LEU2</i>	Функциональный ген <i>LEU2</i> встроен в locus <i>ARG2</i> , специфический аллель <i>arg2-10</i> нефункционален
<i>cyc1-arg2</i>	Слияние генов <i>CYC1</i> и <i>ARG2</i> , представленных нефункциональными аллелями
<i>P_{CYC1}-ARG2</i>	Слияние между промотором <i>CYC1</i> и <i>ARG2</i> , при этом ген <i>ARG2</i> функционален

Мейотический анализ можно использовать для того, чтобы установить, является ли исследуемая мутация изменением единственного генетического локуса, а также определить генетическое сцепление мутации с центромерой и с другими маркерами, участвующими в скрещивании. Как показано на рис. 3, исследуемый мутант *MATα yfg1* скрещивают с нормальным штаммом *MATα*, изолируют диплоиды и индуцируют у них споруляцию. Для анализа нужны четырехспоровые аски и, как правило, спорулирующие культуры их содержат, наряду с диплоидными клетками, которые не смогли проспорулировать, а также с асками, в которых менее четырех спор. Спорующую культуру обрабатывают пищеварительным соком виноградной улитки, который содержит фермент, растворяющий оболочки асков, но оставляющий споры из

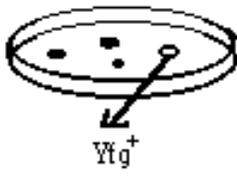
одного аска слипшимися друг с другом. Часть культуры, обработанной соком улитки, переносят на блок прозрачной агаризованной среды и с помощью микроманипулятора четыре споры из одного аска рассаживают по отдельности на поверхности питательной среды. Таким образом изолируют желаемое количество тетрад. Блок питательной среды с изолированными на его поверхности аскоспорами инкубируют, давая спорам прорасти и образовать моноспорные клоны. Затем учитывают гаплоидные сегреганты с фенотипами Yfg^+ и Yfg^- . Поскольку четыре споры, образующие тетраду, являются продуктами одного и того же мейотического события, расщепление $2 Yfg^+ : Yfg^-$

Клонирование гена дикого типа по комплементации

Трансформация штамма *MAT_αyfg1 ura3-52* банком генов YCr50

↓

Изоляция трансформантов Ura⁺ и скрининг на фенотип Yfg⁺

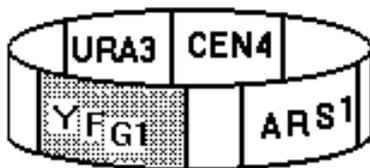


Yfg⁺

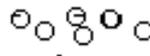
Нарезка плазмиды YCr-YFG1⁺ в клетках *E. coli*

↓

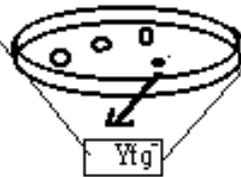
Анализ плазмиды посредством переваривания эндонуклеазами рестрикции и секвенирования ДНК



Выделение мутантов
Мутагенез у гаплоидного штамма MAT α



Обнаружение Yfg⁻



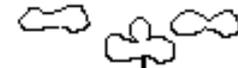
Yfg⁻

Комплементация
Скрещивания мутанта Yfg⁻ MAT α с тестерными штаммами MAT α . Выделение диплоидных штаммов. Учет фенотипов Yfg⁺ и Yfg⁻

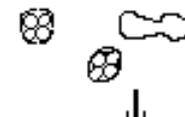
- | | | | |
|---------------------|---|-------------------------------|---|
| MAT α yfg1 x | { | MAT α YFG ⁺ | ○ |
| | | MAT α yfg1 | ● |
| | | MAT α yfg2 | ○ |
| | | MAT α yfg3 | ○ |
| | | и пр. | ○ |

Мейотический анализ

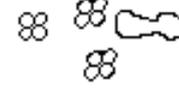
Скрещивание мутанта со штаммом MAT α YFG⁺



Изоляция диплоидного штамма и споруляция



Переваривание стенок асков



Изоляция 4 спор из каждого аска



Учет фенотипов Yfg⁺ и Yfg⁻

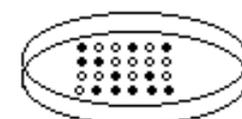


Рис. 3. Основные методы генетического анализа

указывает на детерминацию фенотипа Yfg^- мутантным аллелем одного ядерного гена. Если в скрещивании участвуют также другие генетические маркеры, из характера расщепления мейотического потомства по фенотипам можно установить наличие или отсутствие сцепления анализируемой мутации с другими маркерами или с центромерой [19, с. 424-426].

Наконец, для получения молекулярных характеристик мутации *yfg1* можно клонировать ген *YFG1*⁺ дикого типа по комплементации. Клонирование мы рассмотрим более подробно. Его существенным элементом является генетическая трансформация [20, с. 315-325].

4.3. Трансформация у дрожжей

Вообще под трансформацией понимают введение в клетки ДНК, добавленной извне, и ее последующие наследование и экспрессию. Наиболее существенные достижения в определении молекулярных характеристик и в контролируемой модификации генов дрожжей основаны на применении челночных векторов, которые могут быть использованы для трансформации как дрожжей, так и клеток *E. coli*.

В настоящее время применяются три основных метода трансформации дрожжей: (а) метод, использующий сферопласты, (б) метод, использующий обработку клеток солями лития, и (в) метод, основанный на использовании электропорации [21, с. 140-145].

Сферопласты для трансформации получают в результате действия гидролитических ферментов, частично удаляющих клеточную стенку, в присутствии осмотических стабилизаторов, типичным примером которых может служить 1 М сорбит. Клеточную стенку разрушают либо экстрактом из пищеварительных органов улиток, обычно именуемым глюзулазой, или зимолиазой, ферментом бактерий *Arthrobacter luteus*. Трансформирующую ДНК добавляют к сферопластам и проводят соосаждение смеси раствором

полиэтиленгликоля (ПЭГ), содержащим ионы Ca^{2+} . Вслед за этим клетки ресуспендируют в растворе сорбита, смешивают с еще не застывшим агаром и затем выливают на поверхность чашки с селективной средой, содержащей сорбит. При использовании этой процедуры эффективность трансформации может варьировать в диапазоне четырех порядков величины, в зависимости от штамма. Все же для некоторых штаммов можно получить довольно высокую эффективность, достигающую величины 10^4 трансформантов на 1 мкг ДНК [22, с. 103-107].

Большинство исследователей используют для трансформации клетки, обработанные солями лития. После обработки клеток ацетатом лития, который, по-видимому, увеличивает проницаемость клеточной стенки, добавляют ДНК и клетки соосаждают ПЭГ. Клетки подвергают непродолжительному тепловому шоку, отмывают от ПЭГ и ацетата лития и распределяют по поверхности обычной селективной среды. Эффективность трансформации может быть увеличена при использовании специально приготовленной однострессовой ДНК-носителя и некоторых органических растворителей [23, с. 138-144].

Широко используемый метод трансформации различных видов клеток, основан на индукции проницаемости клеток для ДНК под действием электрических полей. Свежевыращенные культуры дрожжей отмывают, суспендируют в растворе осмотического протектора, например сорбита, добавляют ДНК и суспензии клеток сообщают импульс с помощью прибора для электропорации. Затем клетки распределяют по поверхности селективной среды. Для повышения эффективности электропорационной трансформации используют ПЭГ, однострессовую ДНК-носитель и клетки, находящиеся в поздней логарифмической фазе роста. Несмотря на простоту метода, оборудование, требуемое для его реализации, недешево [24, с. 648-660].

4.4. Векторы дрожжей

В соответствии с разнообразием требований, которые диктуются необходимостью осуществлять делеционные или инсерционные изменения в генах, а также обеспечивать экспрессию генов в клетках дрожжей, имеются в наличии многочисленные векторы. Большинство плазмид, используемых в работе с дрожжами, представляют собой челночные векторы, которые содержат последовательности, обеспечивающие репликацию плазмид в клетках *E. coli*, а также последовательности, служащие селективными маркерами при поддержании плазмид в бактериальных клетках. Наиболее распространенные векторы дрожжей являются производными известной плазмиды pBR322 и содержат ориджин репликации (*ori*), обеспечивающий высокую копийность плазмиды в клетках кишечной палочки, и селективные маркеры устойчивости к антибиотикам – ген *bla*, определяющий устойчивость к ампициллину, и иногда ген *tet* – ген резистентности к тетрациклину [25, с. 476-479].

Кроме того, все векторы дрожжей содержат маркеры, позволяющие отбирать трансформанты, которые получили желаемую плазмиду. Наиболее часто в качестве таких селективных маркером используются гены *URA3*, *HIS3*, *LEU2*, *TRP1* и *LYS2*, которые комплементируют специфические мутации ауксотрофности, соответственно, *ura3-52*, *his3-Δ1*, *leu2-Δ1*, *trp1-Δ1* и *lys2-201*. Эти мутации выбраны для работы, главным образом, потому, что у них весьма низки частоты реверсий. Кроме того, гены дрожжей *URA3*, *HIS3*, *LEU2* и *TRP1* способны комплементировать специфические мутации ауксотрофности у *E. Coli* [26, с. 97-101].

Несмотря на разнообразие имеющихся челночных векторов для работы с дрожжами, векторы, используемые в настоящее время, в общем разбиваются на 3 класса (табл. 7): интегративные векторы YIp; автономно реплицирующиеся многокопийные векторы YEр (их еще называют эписомными) и автономно реплицирующиеся векторы с низкой копийностью (YСр), они же кольцевые

минихромосомы. Есть еще один специализированный вид векторов, именуемых рУАС и используемых для конструирования искусственных хромосом, но о них речь будет идти отдельно, а сейчас рассмотрим ранее названные три сорта векторов [27, с. 1242-1246].

4.4.1. Векторы YPr

Интегративные векторы YPr неспособны реплицироваться автономно, но с низкой частотой интегрируются в геном посредством гомологичной рекомбинации. Рекомбинационная интеграция кольцевой плазмидной ДНК приводит к тому, что копия векторной последовательности фланкируется прямым повтором последовательности дрожжей, как видно в верхней части рисунка 4. Сайт интеграции намечают, разрезая дрожжевой сегмент плазмиды YPr рестрикционной эндонуклеазой, и трансформируют дрожжевые клетки линейаризованной плазмидой. Линейные концы рекомбинагенны и обеспечивают непосредственную интеграцию плазмиды в сайт генома, гомологичный этим концам. Вдобавок линейаризация приводит к повышению эффективности трансформации в 10-50 раз [28, 29].

Для векторов YPr обычно характерна однокопийная интеграция. С низкой частотой, однако, может происходить множественная интеграция, которая позволяет конструировать стабильные штаммы со сверхэкспрессией специфических генов. Плазмиды типа показанной на рис. 4, т.е. имеющие два дрожжевых сегмента, например, *YFG1* и *URA3*, потенциально могут интегрироваться в каждый из этих геномных локусов, тогда как векторы, содержащие

Таблица 7. Компоненты плазмидных векторов дрожжей

	Вектор			
	YIp	YEр	YRp	YCr
Гены или сегменты <i>E. coli</i> <i>ori, bla, tet</i>	+	+	+	+
Гены или сегменты дрожжей <i>URA3; HIS3; LEU2; TRP1; LYS2</i> и пр. <i>leu2-d</i>	+	+	+	+
<i>2 μm; 2 μm-ori REP3</i>	0	+	+	0
<i>ARS1; ARS2; ARS3</i> и пр.	0	+	0	0
<i>CEN3; CEN4; CEN11</i> и пр.	0	0	+	+
Маркеры хозяйских клеток (дрожжей) <i>ura3-52; his3-Δ1; leu2-Δ1; trp1-Δ1; lys2-201</i> и пр.	0	0	0	+
Стабильность	++	+	±	+

повторяющиеся последовательности ДНК, например повторяющиеся элементы Ту или рДНК, могут интегрироваться в любой из множественных сайтов в геноме. Штаммы, сконструированные с использованием плазмид YIp, нужно проверять с помощью ПЦР или другими методами для подтверждения сайта интеграции [30, с. 11-13].

Существенной характеристикой трансформантов вообще и, в частности, трансформантов, полученных при использовании интегративных векторов, является митотическая стабильность, т.е., грубо говоря, доля клеток в культуре, сохраняющих трансформированный фенотип. Штаммы, трансформированные плазмидами YIp, по сравнению с трансформантами, несущими другие плазмиды, чрезвычайно стабильны даже в отсутствие селективного давления. Однако интегрированная плазида все-таки может теряться с частотой приблизительно 10^{-3} - 10^{-4} благодаря гомологичной рекомбинации между тандемными повторами ДНК, при этом происходит выпетливание векторной последовательности и одной из дублированных копий, которые ее фланкируют [31, с. 834-839].

4.4.2. Векторы YEp

Эписомные плазмидные векторы YEp могут автономно реплицироваться в клетках дрожжей благодаря присутствию сегмента 2 мкм плазмиды, служащего ориджином репликации (2 μ m *ori*). Этот ориджин обеспечивает высокую частоту трансформации и присутствие множественных копий плазмиды в клетке [32, с. 1571-1576].

Векторы YEp могут содержать копию 2 мкм плазмиды целиком, но в большинстве случаев они содержат только область плазмиды, в которой присутствуют последовательность *ori* и ген *REP3*. Ген *REP3* является цис-активным, т.е. должен быть на одной плазмиде с *ori*. Присутствие гена *REP3* на плазмиде вместе с *ori* необходимо, чтобы опосредовать действие транс-активных генов *REP1* и *REP2*. Эти гены кодируют продукты, которые способствуют распределению копий плазмиды между материнской и дочерней клетками при делении. Соответственно, гены *REP1* и *REP2* могут сами и не присутствовать в векторе YEp; в клетках *cir+*, содержащих множественные копии эндогенной 2 мкм

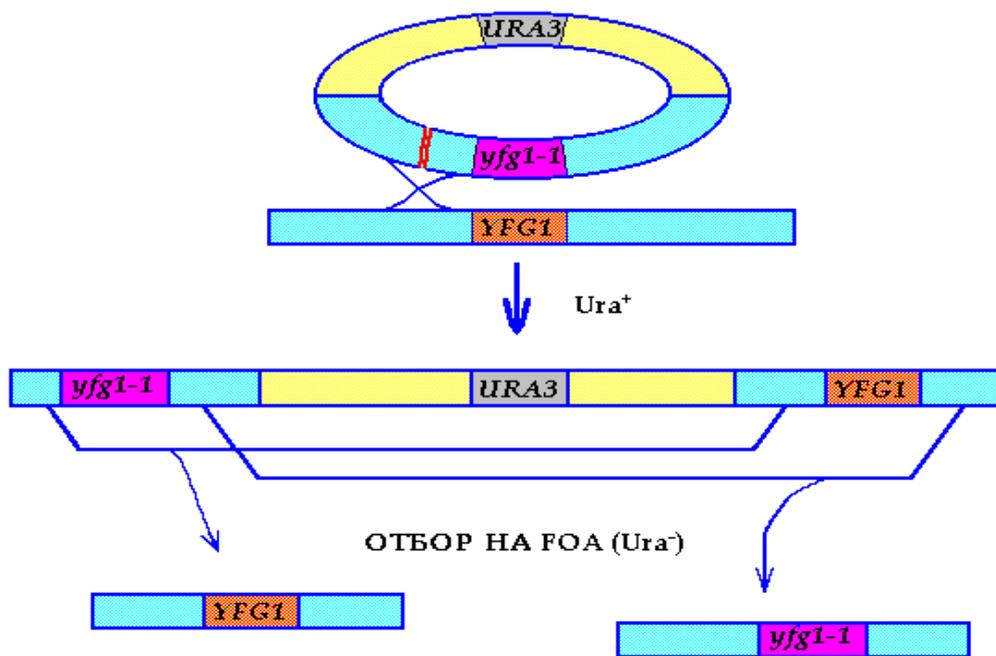


Рис. 4. Двухэтапное замещение гена

плазмиды, действие генов *REP1* и *REP2*, присутствующих на этих копиях, способно обеспечить поддержание в клетках вектора Υ Er, содержащего только *ori* и *REP3*.

По большей части плазмиды Υ Er относительно нестабильны. Темп их потери, т.е. вероятность утраты плазмиды на одну генерацию, составляет от одного до нескольких процентов. При размножении в неселективных условиях митотическая стабильность таких плазмид обычно не превышает 40%, в селективных условиях она повышается до 60-95% [33, с. 744-746].

Число копий плазмиды Υ Er на 1 клетку (копийность) для клеток *sig+* колеблется в пределах от 10 до 40, но плазмиды распределяются между клетками не поровну, и число копий на клетку в разных популяциях сильно варьирует [34, с. 2-5].

Имеются несколько систем, обеспечивающих очень высокую копиюность плазмид Υ Er. Одна из таких систем использует мутацию *leu2-d*, определяющую частичную дефектность клеток по биосинтезу лейцина. Уровень экспрессии этого аллеля, по сравнению с уровнем экспрессии нормального аллеля *LEU2+*, ниже на несколько порядков. Копийность векторов Υ Er-*leu2-d* составляет от 200 до 300, и после размножения в среде с дефицитом лейцина эта высокая копиюность сохраняется на протяжении многих генераций уже при размножении в неселективных условиях. Векторы Υ Er-*leu2-d* применимы при больших объемах культур, выращиваемых на полноценных средах, на которых селекция плазмид невозможна. Чаще всего векторы Υ Er используют в тех случаях, когда необходима сверхпродукция какого-либо генного продукта [35, с. 8-13].

4.4.3. Векторы YCr

Центромерные плазмидные векторы YCr способны автономно реплицироваться и содержат центромерные последовательности *CEN* и автономно реплицирующиеся последовательности *ARS*. Копийность этих плазмид низка, обычно составляет от 1 до 3; во всяких рассуждениях плазмиды YCr чаще всего вообще рассматриваются как однокопийные [36, с. 825-833]. Темп потери таких плазмид в неселективных условиях составляет приблизительно 1% на генерацию. В тетрадах, полученных от скрещивания трансформанта с YCr и нормального штамма, достаточно часто наблюдается расщепление 2:2 по наличию/отсутствию плазмиды. То есть поведением в митозе (низкая копияность) и в мейозе (регулярная сегрегация) векторы YCr имитируют хромосомы дрожжей. Эти векторы называют еще кольцевыми минихромосомами. Последовательности *ARS*, входящие в состав векторов YCr, либо просто соответствуют природным ориджинам репликации хромосом дрожжей, либо имеют с этими ориджинами существенные черты сходства. Все они содержат консервативный элемент длиной 11 п.н., именуемый ACS (*ARS consensus sequence*). Функция центромерной последовательности *CEN* зависит от трех консервативных доменов, обозначаемых I, II и III; для митотической стабилизации векторов YCr необходимы все эти три элемента. Векторы YRp, содержащие *ARS*, но лишенные функциональных элементов *CEN*, трансформируют клетки дрожжей с высокой эффективностью, но слишком легко утрачиваются, темп их потери составляет 10% и выше. Соответственно их применение в качестве векторов ограничено [37, с. 179-187].

Приемлемая митотическая стабильность и низкая копияность векторов YCr делают предпочтительным их использование в качестве векторов для клонирования, конструирования библиотек геномных ДНК, исследования функций генов. Наиболее часто в векторах YCr используется элемент *ARS1*, находящийся у дрожжей в хромосоме IV в непосредственной близости от

локуса *TRP1*. Наиболее употребительные и удобные для манипуляций центромерные элементы - *CEN3*, *CEN4* и *CEN11*. Например, вектор YCr50 содержит элементы *CEN4* и *ARS1* [38, с. 85-90].

4.5. Гены, используемые в генетических манипуляциях и исследованиях.

4.5.1. Гены *URA3* и *LYS2*

Гены дрожжей *URA3* и *LYS2* в качестве маркеров для векторов дрожжей обладают дополнительным преимуществом, поскольку при их использовании возможна как позитивная, так и негативная селекция, т.е. отбор как клеток, содержащих плазмиду, так и клеток, утративших ее. Позитивная селекция основана на комплементации ауксотрофности, определяемой, соответственно, мутациями *ura3* и *lys2*, тогда как для негативной селекции используют специфические ингибиторы, соответственно, 5-фтороротовую кислоту (FOA) и α -аминоадипиновую кислоту (α AA), которые подавляют размножение прототрофных штаммов, но не препятствуют росту мутантов, соответственно, *ura3* и *lys2*. Ген *URA3* используют, по-видимому, более часто. Он кодирует фермент оротидин-5'-фосфат-декарбоксилазу, который необходим для биосинтеза урацила. Мутанты *ura3* можно отбирать на среде, содержащей FOA. По-видимому, под действием декарбоксилазы Ura3, имеющейся у нормальных клеток, FOA превращается в токсичный 5-фторурацил, и нормальные клетки на среде с FOA погибают, а мутанты *ura3* способны размножаться. Это обстоятельство используют для изгнания из клеток плазмид с маркером *URA3*. При работе с такими плазмидами чаще всего используют хозяйские клетки, маркированные мутацией *ura3-52*. Этот аллель содержит инсерцию мобильного элемента Ty1 и не ревертирует [39, с. 108-110].

4.5.2. Гены *ADE1* и *ADE2*.

Эти два гена были очень популярны у исследователей уже на ранних стадиях развития генетики дрожжей. Ген *ADE1* кодирует фосфорибозиламиноимидазолсукцинокарбоксамид-синтетазу, продуктом гена *ADE2* является фосфорибозиламиноимидазол-карбоксилаза. Вообще биосинтез аденина у дрожжей контролируют по меньшей мере 8 неаллельных генов, но только мутации *ade1* и *ade2* вызывают образование красного пигмента мутантными клетками. Пигмент, по-видимому, образуется в результате полимеризации промежуточного продукта биосинтеза аденина фосфорибозиламиноимидазола (AIR). Мутации в генах, контролирующих более ранние этапы биосинтеза, по сравнению с генами *ADE1* и *ADE2*, блокируют синтез AIR. Например, мутанты *ade2* накапливают пигмент и образуют красные колонии, мутанты *ade3* пигмента не накапливают и дают белые колонии, двойные мутанты *ade2 ade3* не накапливают пигмент, поскольку синтез AIR блокирован, пигменту образовываться не из чего; соответственно колонии двойных мутантов будут белыми. У генетиков такое взаимодействие мутаций, когда один мутантный фенотип маскируется другим, называется эпистазом. Мутация *ade3* эпистатична по отношению к мутации *ade2* [40, с. 374-392].

Различия в пигментации легко обнаруживаются визуально. Пусть например, клетки несут одновременно мутацию *ade2* в геноме и плазмиду с нормальным геном *ADE2*. Клетки, сохраняющие плазмиду, будут образовывать белые колонии. В действительности, конечно, колонии будут более или менее розоватыми, поскольку происходит потеря плазмиды и благодаря этому на поверхности колонии образуется множество мельчайших красных крапинок пигмента, накопленного клетками, которые потеряли плазмиду на последних стадиях роста колонии. Представим себе, что клетки высеяны на плотную питательную среду. В первом делении после посева у определенной доли клеток, которая определяется темпом потери плазмиды, будет происходить эта

потеря, т.е. из двух клеток, получившихся после первого почкования, плаزمида останется только в одной. Потомки клеток, сохранивших плазмиду, не будут накапливать пигмент, потомки же клетки, потерявшей плазмиду, будут пигментированными. В результате образуется колония, состоящая из двух равновеликих секторов, проще говоря, из двух половинок. Подсчитав такие колонии в расщепе, можно определить темп потери плазмиды [41, с. 581-603].

Допустим, что клетки представляют собой диплоиды или дисомики, т.е. гаплоиды, у которых одна из хромосом присутствует в двух экземплярах, и такие клетки гетерозиготны по мутации *ade1* или *ade2*, т.е. каждая клетка имеет одну хромосому с мутантным, а другую с нормальным аллелем этого гена, Такие клетки будут образовывать непигментированные колонии, поскольку рассматриваемые мутации рецессивны. Если же клетка потеряет одну из двух хромосом, а именно ту, в которой присутствует аллель дикого типа, то клетка сохранит жизнеспособность, но будет уже давать пигментированное потомство. Если подобрать селективные условия, в которых клетки, не потерявшие хромосому, а также клетки, потерявшие не ту, т.е. мутантную, хромосому, не смогут размножаться, то можно селекционировать редкие события спонтанной потери хромосом и, соответственно, оценивать их частоты (у диплоидов рассматриваемые события происходят с частотой порядка 10^{-7}) [42, с. 1054-1059],

Мутация *ade2-1* обусловлена преждевременным возникновением в открытой рамке считывания терминирующего кодона ochre (UAA). В результате генный продукт синтезируется в укороченном и нефункциональном виде. Фенотипический эффект этой мутации, т.е. накопление пигмента, снимается геном-супрессором *SUP4*-о. (Этот ген кодирует измененную тРНК, которая может принимать терминирующий кодон за осмысленный, благодаря чему восстанавливается трансляция полноразмерного и частично функционального белка.) Гены *ade3* и *SUP4* в сочетании с мутантными

аллелями *ade2* находят себе разнообразное применение для генетического скрининга [43, с. 227].

4.5.3. Промотор *GAL1*

Клонированные гены могут экспрессироваться с конститутивного или регулируемого промотора. По-видимому наиболее активно используемым в работе с дрожжами регулируемым промотором является промотор P_{GAL1} [44, с. 702-715].

От двух регуляторных белков, Gal4p и Gal80p, зависит транскрипция следующих галактозных структурных генов: киназного гена *GAL1*, пермеазного гена *GAL2*, трансферазного гена *GAL7*, эпимеразного гена *GAL10* и галактозидазного гена *MEL1*. Белок Gal3p, по-видимому, необходим для продуцирования клеточного индуктора из галактозы. В присутствии индуктора Gal4p связывается с сайтами в вышележащей активирующей последовательности (UAS) и активирует транскрипцию. В отсутствие индуктора, например, когда культуру клеток выращивают в среде с несбраживаемым источником углерода (например, со смесью глицерина и этанола), белок Gal80p связывается с С-концевой областью Gal4p и маскирует активирующий домен. У клеток, помещенных в среду с глюкозой, для подавления экспрессии галактозных генов имеются, помимо отсутствия индуктора, дополнительные причины, в частности, действие репрессоров в сайтах между UAS и ТАТА-боксом и ингибирование включения галактозы клетками. Поэтому добавление глюкозы в культуру клеток, растущую на галактозе, вызывает немедленную репрессию транскрипции (рис. 5). UAS галактозных структурных генов содержат одну или несколько палиндромных последовательностей длиной 17 п.н., с которыми связывается Gal4p. Уровень транскрипции зависит от количества и комбинаторики этих палиндромов [45, с. 309-317].

UAS генов *GAL1* и *GAL10*, расположенных по соседству и транскрибируемых дивергентно, т.е. в разные стороны, содержится внутри фрагмента P_{GAL1} длиной 365 п.н., который достаточен для максимальной галактозной индукции и эффективной глюкозной репрессии. После добавления галактозы в культуру клеток, растущих на несбраживаемом субстрате, P_{GAL1} может обеспечить быструю индукцию экспрессии присоединенных к нему нижележащих генов, вплоть до тысячекратной. Добавлением глюкозы в среду, содержащую галактозу, P_{GAL1} можно выключить. P_{GAL1} использован во множестве работ для сверхпродуцирования белков дрожжей, а также гетерологичных белков. Сильная глюкозная репрессия P_{GAL1} позволяет определять терминальный фенотип жизненно важных генов, подобно тому, как сдвиг температуры используется для контроля активности температурочувствительных мутаций. Этот промотор используется также для исследования явлений супрессии генетических дефектов или ингибирования роста при сверхпродуцировании определенных белков. Кроме того, как будет рассказано далее, P_{GAL1} служит важным компонентом одной из дигибридных систем [46, 47, 48].

4.5.3. *lacZ* и другие репортерные гены

Активности промоторов, а также наличию белок-белковые взаимодействия и взаимодействия белков с ДНК, в которых участвуют промоторные области, нетрудно поставить в соответствие селективный признак, доступный количественной оценке. Для этого бывает достаточно осуществить слияние промотора с репортерным геном. Репортерные гены можно использовать для определения уровня транскрипции или уровня трансляции транскрипта при различных физиологических условиях. Наиболее общим применением репортерных генов оказалась идентификация цис-активных элементов, необходимых для транскрипции. С этой целью проводили

систематический анализ серий мутаций в промоторных областях. Сходным образом репортерные гены использовались для идентификации транс-активных факторов, модулирующих экспрессию, т.е. транскрипцию или трансляцию [49, 50].

Ген *lacZ Escherichia coli*, кодирующий β -галактозидазу, - едва ли не наиболее употребительный репортерный ген, используемый в работе с дрожжами и в других системах. Активность этого гена допускает полуколичественную оценку при высеве клеток на чашку и вполне количественную оценку посредством определения ферментативной активности в жидких культурах. Используя искусственный субстрат X-gal (5-бром-4-хлор-3-индолил- β -D-галактозид), при расщеплении которого β -галактозидазой образуется продукт голубого цвета, можно по дифференциальному окрашиванию колоний определить редкие события, вызывающие изменения экспрессии репортерного гена [51, с. 345-384].

Если иметь в виду позитивную селекцию на основе экспрессии репортерного гена, то такой репортерный ген может включать в себя, например, транслируемую область гена *HIS3*, лишенную UAS (т.е. вышележащей активирующей последовательности). Колонии His⁺ будут возникать при образовании активных промоторов, например при клонировании гетерологичных компонентов, требуемых для активации определенного сегмента ДНК. Для идентификации транс-активных факторов обычно комбинируют *HIS3*-селекцию и *lacZ*-скрининг при использовании одной и той же промоторной области [52, с. 188-195].

4.6. Манипулирование геномом *in vitro* с помощью плазмид

Самое крупное преимущество использования дрожжей состоит в легкости, с которой гены можно извлекать, делетировать, встраивать и модифицировать контролируемым образом. Эти методы используют сочетание технологий рекомбинантных ДНК, трансформации и процедур классической генетики. Рассмотрим некоторые из основных подходов [53, с. 371-384].

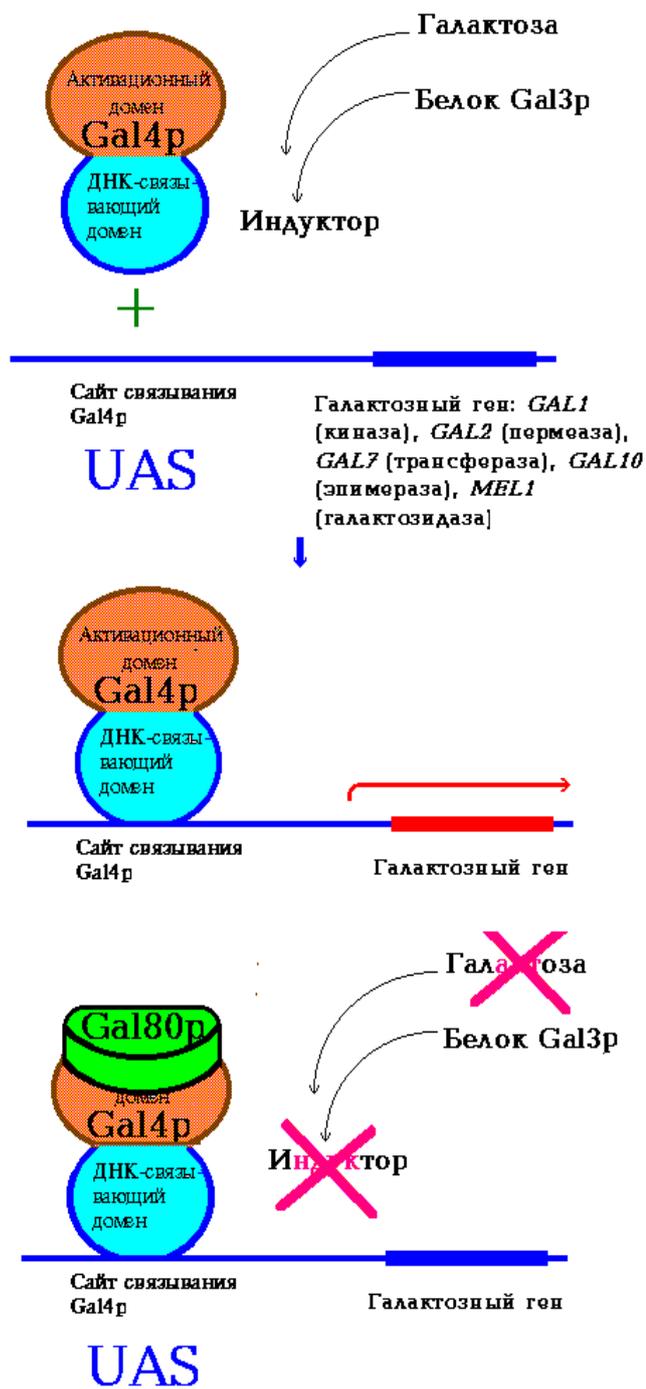


Рис. 5. Схема регуляции экспрессии галактозных генов

4.6.1. Клонирование по комплементации

Молекулярное клонирование и анализ ДНК - это есть наиболее определенный путь получения характеристик гена, соответствующего изучаемой мутации. Штамм *yfg1* трансформируют библиотекой генов на основе вектора YCp и среди полученных трансформантов ищут клоны с фенотипом Yfg^+ . Векторы YCp используют в основном по той причине, что каждая трансформированная клетка содержит одну копию или очень небольшое число копий такой плазмиды. Скрининг трансформантов может производиться по-разному, в зависимости от того, какой именно фенотип желательно обнаружить. В некоторых случаях возможна прямая селекция. Однако, если исходная мутация ревертирует, как это часто бывает, среди трансформантов с большой частотой будут обнаруживаться фальшивые позитивные клоны. В этом случае лучше использовать непрямую селекцию с помощью перепечатывания. Частоты клеток с фенотипом Yfg^- будут существенно различны в клоне, несущем плазмиду с нормальным аллелем $YFG1^+$ и в клоне, у которого мутация *yfg1* ревертировала. Генные реверсии, как правило, довольно стабильны, а митотическая стабильность плазмид YCp даже в селективных условиях все-таки заметно отличается от 100%. Так что при перепечатке на селективную среду должна выявиться практическая однородность ревертантов по фенотипу Yfg^+ и гетерогенность клонов, клетки которых имеют ген $YFG1^+$ на плазмиде и часто его теряют, превращаясь при этом из клеток Yfg^+ в клетки Yfg^- [54, с. 279-281].

Кроме того, у истинных позитивных трансформантов фенотип Yfg^+ должен быть однозначно ассоциирован с присутствием в клетках плазмиды $YCp-YFG1^+$. В очень многих работах зависимость или независимость фенотипа от присутствия плазмиды с удобством устанавливали, используя систему *ura3*, обычно неревертирующий аллель *ura3-52* [55, 56, 57].

Варианты, потерявшие плазмиду, можно отбирать на среде с FOA, затем определяют их фенотип. Например, клон *yfg1 ura3* с плазмидой YCr-*YFG1*⁺, будет иметь фенотип Yfg⁺ Ura⁺, а клон *yfg1 ura3*, потерявший плазмиду, будет иметь фенотип Yfg⁻ Ura⁻. Если дело действительно обстоит таким образом, следует плазмидную ДНК амплифицировать в клетках *E. coli* и провести ретрансформацию клеток дрожжей *yfg1* полученным препаратом, чтобы окончательно убедиться в наличии на плазмиде желанного гена [58, с. 891-907].

Желательно также убедиться в том, что клонированный сегмент в самом деле включает в себе ген *YFG1*⁺. Хотя обычно трансформант и может нести лишь единственную копию клонированного гена, известны случаи, когда две копии гена дикого типа, одна в хромосоме и другая на плазмиде, способны супрессировать мутацию, затрагивающую другой локус (т.н. многокопийная супрессия). Чтобы исключить такую возможность, надо клонированный сегмент переклонировать в интегративную плазмиду YIp. Если вставка содержит уникальный сайт рестрикции, то разрезание интегративной плазмиды по этому сайту повысит частоту интеграции плазмиды в гомологичный сайт хромосомы. В отсутствие разрезания плазида будет интегрироваться также в хромосомные сайты, соответствующие маркерным генам плазмиды. После получения интегранта сайт интеграции можно определить с помощью мейотического анализа. Например, интеграция плазмиды p[*YFG1*⁺ *URA3*⁺] в сайт локуса *YFG1*⁺ штамма *ura3* даст штамм *YFG1*⁺::[*YFG1*⁺ *URA3*⁺] *ura3*. Если его скрестить со штаммом *yfg1 ura3*, то мейотические сегреганты полученного гибрида будут давать расщепление 2:2 как по признаку Yfg⁺/Yfg⁻, так и по признаку Ura⁺/Ura⁻; при этом будут обнаруживаться тетрады только родительского дитипа по обоим маркерам, т.е. 2 Yfg⁺ Ura⁺: 2 Yfg⁻ Ura⁻ [59, с. 37-41].

С другой стороны, если гомологичная рекомбинация обеспечивает интеграцию плазмиды YIp не в локус *YFG1*⁺, а в какой-то другой локус (т.е. локус *YFG1*⁺ в действительности на плазмиде не присутствует), то скрещивание

интегранта со штаммом *yfg1 ura3* даст постмейотическое потомство в котором частота клонов Yfg^+ будет более 50%, вероятнее всего будут наблюдаться три типа тетрад: P ($2Yfg^+ : 2Yfg^-$), N ($4Yfg^+ : 0Yfg^-$) и T ($3Yfg^+ : 1Yfg^-$) в соотношении 1:1:4. Такой результат будет показывать, что клонированный ген, комплементирующий мутацию *yfg1*, находится не в локусе *YFG1*, а в совсем другом хромосомном локусе и, стало быть, не идентичен $YFG1^+$ [60, с. 360-370].

Конечно, если хотят клонировать ген с известной нуклеотидной последовательностью, тогда с помощью ПЦР можно непосредственно установить, то ли клонировали, что хотели. Если получены данные, подтверждающие клонирование желаемого гена с неизвестной последовательностью, клонированный фрагмент субклонировуют с помощью эндонуклеаз рестрикции и тем самым по возможности удаляют из него последовательности, не представляющие интереса. Фрагмент, полученный после субклонирования можно затем секвенировать и изучать разнообразными методами [61, с. 463-469].

4.6.2. Мутагенез *in vitro*

Часто требуется получить либо специфичные, либо случайные мутации в определенном гене. Изменения ДНК нужны для исследования, например, взаимосвязи структуры и функции белков, выявления их наиболее важных областей и для получения условных мутаций, например температурочувствительных мутаций. Специфические изменения осуществляют благодаря использованию общей процедуры направленного мутагенеза, когда репликация желаемого гена представляет собой достраивание по генной матрице олигонуклеотида, гомологичного последовательности гена, но содержащего желаемые изменения последовательности [62, с. 599-607].

Разработаны также процедуры получения случайных, или неупорядоченных (random) точковых мутаций, в том числе обработка

плазмидной ДНК гидроксиламином и ошибочное включение нуклеотидов при ПЦР-мутагенезе. Для локализованного мутагенеза в генах дрожжей разработана простая процедура (рис. 6). Сначала область, в которую хотят внести изменения, амплифицируют посредством ПЦР в мутагенных условиях. В результате получают фрагменты, содержащие “случайные” мутации *yfg1-x*. Затем осуществляют совместную трансформацию штамма *yfg1-Δ* этими ПЦР-продуктами и плазмидой YCr, в которой сделана брешь и которая имеет гомологию с обоими концами ПЦР-продуктов. Репарация брешей по ПЦР-продуктам даст серию штаммов с плазмидами YCr, содержащими мутантные аллели *yfg1-x*. Поскольку у трансформируемого хозяйского штамма ген *YFG1* делетирован, можно у разных клонов наблюдать разные фенотипы, обуславливаемые разными мутациями *yfg1-x*. Понятно, что при использовании этой процедуры брешь можно делать в том или другом участке гена, и тем самым обеспечивать внутригенную специфичность мутагенеза. Ясно также, что для изложенной методики не требуется субклонирование в клетках кишечной палочки [63, с. 27-37].

4.6.3. Извлечение мутантных аллелей

Трансформация клеток плазмидой с брешью лежит также в основе удобного метода извлечения хромосомных мутаций (рис. 6А). Двунитевую брешь получают разрезанием по двум сайтам рестрикции в клонированном сегменте. Полученную плазмиду с брешью используют для трансформации штамма, у которого желаемая мутация, присутствует в области хромосомы, соответствующей бреши. Брешь репарируется по гомологичной области хромосомы, при этом мутация *yfg1-1* переносится на плазмиду.

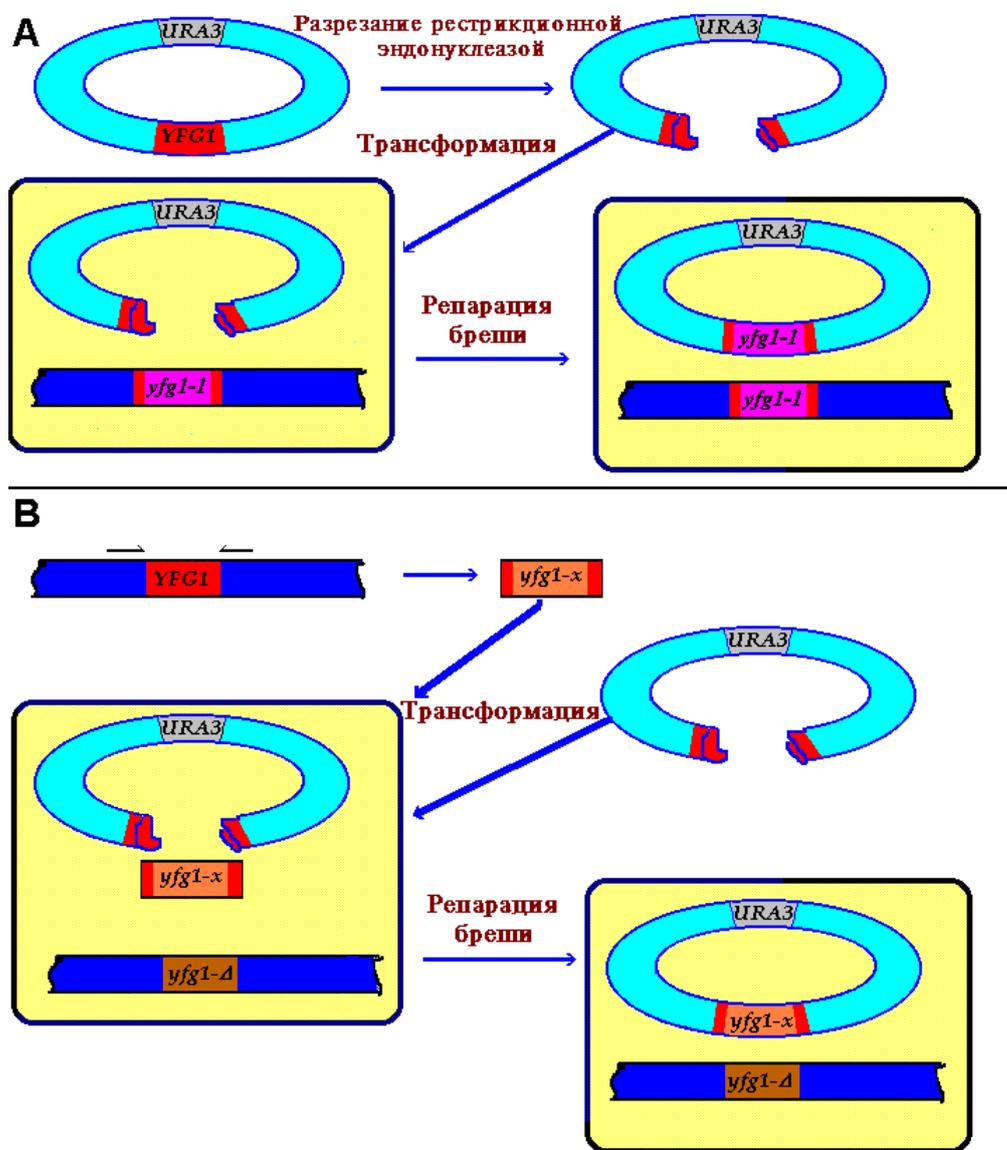


Рис. 6. Извлечение хромосомной мутации *yfg1-1* посредством трансформации мутантных клеток плазмидой с брешью

Отрепарированная плаزمида способна реплицироваться, тогда как плазмиды с брешью, т.е. линейная, такой способности лишена и при размножении клеток будет утрачиваться. Из клона, несущего отрепарированную плазмиду, можно выделить ДНК, трансформировать ею клетки *E. coli* и амплифицировать плазмидную ДНК. Для того, чтобы репарация брешки была возможна, достаточно, чтобы по обе ее стороны имелись последовательности длиной 100 п.н., гомологичные хромосомным последовательностям. Более протяженная гомология будет повышать эффективность процесса [64, с. 400-402].

4.6.4. Двухэтапное замещение гена

После того, как ген клонирован, самым эффективным способом получения мутаций в гене служит описанный выше мутагенез *in vitro* в клонированном сегменте ДНК. Эффекты мутаций можно оценивать *in vivo*, вводя измененные гены в клетки дрожжей посредством трансформации. Простая и самая обычная процедура предполагает трансформацию штамма, не имеющего функциональной копии хромосомного гена, плазмидой YCr , содержащей измененный ген. Это можно сделать без труда в один этап в том случае, конечно, если интересующий исследователя ген не является жизненно важным и может быть полностью утрачен жизнеспособными клетками [65, 479-482].

Но самая лучшая процедура, в отношении которой не возникает проблем с копийностью и векторными последовательностями, предполагает замещение хромосомной копии гена измененной копией гена, находящейся на плазмиде. Это может быть достигнуто с помощью двухэтапного замещения гена (рис. 4). На первом этапе плазмиды YIp , содержащая измененный ген *yfg1-1*, интегрируется в хромосому в области, содержащей нормальный ген YFGI^+ . В результате гомологичной рекомбинации в хромосоме присутствуют две копии любимого гена, YFGI^+ и *yfg1-1*, разделенные плазмидными

последовательностями. Второй этап включает в себя гомологичный кроссинговер по повторяющимся сегментам ДНК с выпетливанием плазмиды вместе с геном *URA3*. Такие сегреганты Ura^- можно отбирать на среде с FOA. Вырезаемая при этом плазида не имеет ориджина репликации и потому при размножении клеток утрачивается [66, с. 749-760].

Второй кроссинговер может происходить по любой из двух областей гомологии, справа или слева от изменения *yfg1-1*. Кроссинговер слева приводит к регенерации нормального аллеля *YFG1*, тогда как кроссинговер справа как раз и осуществляет замену исходного аллеля желаемым мутантным аллелем *yfg1-1*.

В общем случае второй кроссинговер происходит по более или менее случайной позиции и может приводить к появлению как мутантного штамма *yfg1-1*, так и штамма с нормальным аллелем *YFG1*. Однако относительные частоты кроссинговера в двух областях, вероятнее всего, зависят от размеров этих областей. При удалении мутантного аллеля *yfg1-1* второй кроссинговер локализуется в области сайта первоначальной интеграции, размер которой является параметром плазмиды. Чтобы образовался мутантный штамм *yfg1-1*, сайт второго кроссинговера должен находиться не в области сайта интеграции перед мутантным аллелем, а в области за мутантным аллелем, размер которой также является параметром плазмиды. Так что, если мы хотим увеличить относительную вероятность получения мутантного штамма *yfg1-1*, нам следует в плазмиде укоротить одну межгенную область относительно другой. Для того, чтобы при трансформации именно укороченная межгенная область преимущественно служила областью сайта интеграции, ее разрезают рестриктазой [67, с. 1456-1461].

Помимо маркера *URA3*, маркер *LYS2* также может использоваться как для позитивной, так и для негативной селекции. Но даже если же нет возможности использовать *URA3* или *LYS2*, частота второго кроссинговера часто бывает довольно высока и составляет 10^{-3} - 10^{-4} . При таких частотах возможно обнаружить потерю маркера перепечатаванием на селективные среды. Если

ожидается значительная частота элиминации мутантного аллеля при втором кроссинговере, можно в локус *YFG1*⁺ ввести дополнительный маркер для удобства обнаружения желаемого замещения аллеля (например, использовать штамм *ade2 YFG1::ADE2* [68, с. 1274-1280]).

4.6.5. Разрушение гена и одноэтапное замещение гена

Разрушение гена (gene disruption) является одним из наиболее важных методических приемов, используемых при изучении свойств и характеристик гена. Полное разрушение гена дает возможность однозначно выявить его функцию, а также может быть использовано при получении дополнительных мутаций. Для получения делеций и нулевых мутаций можно использовать несколько методов, в том числе двухэтапное замещение гена, о котором уже было рассказано.

По причине своей простоты предпочтительной часто оказывается процедура одноэтапного замещения гена. При этом используется линейный фрагмент ДНК: который содержит селективный маркер: фланкированный 5'- и 3'-областями гомологии (рис. 7А). Свободные концы фрагмента, полученные действием рестрикционных эндонуклеаз, рекомбинагенны; рекомбинация приводит к интеграции маркера *URA3* и утрате аллеля дикого типа *YFG1*.

Понятно, что в том случае, когда ген *YFG1* является жизненно важным, для трансформации следует использовать диплоидный штамм. Замещение гена должно быть подтверждено с помощью ПЦР или Southern-блоттинга. ПЦР может быть также использована для создания фрагмента, который используется для одноэтапного замещения.

Поскольку процедура одноэтапного замещения гена приводит к появлению штамма *URA3*⁺, метод был модифицирован, как показано на рис. 7В. Модификация состоит в том, что *URA3* фланкирован идентичными копиями бактериального гена *hisG* (или другого сегмента гетерологичной ДНК). Сначала

для разрушения гена используют конструкцию *hisG-URA3-hisG*, затем в результате рекомбинации между прямыми повторами и селекции на FOA получается штамм, у которого в разрушенном гене *YFG1* остается одна копия *hisG*. Это уже получается, в сущности, двухэтапное разрушение гена, а ген *URA3* может быть вновь использован для разрушения другого гена у того же штамма [69, с. 791-797].

Сходная процедура позволяет осуществить одноэтапную замену нормального аллеля мутантным (рис. 5С). При этом сначала разрушают ген *YFG1* встраиванием *URA3*, а затем с помощью трансформации фрагментом ДНК с мутантным аллелем *yfg1-1* и отбора на FOA (непосредственно после трансформации или после некоторого подрачивания трансформантов на полноценной среде) осуществляют замену разрушенного гена мутантным аллелем. Данная процедура особенно выигрышна в тех случаях, когда требуется осуществить большое количество замен.

Для разрушения гена и одновременного тестирования промоторной активности используется также модуль доминантной резистентности, почти целиком состоящий из гетерологичной ДНК. Отбирают трансформанты, резистентные к генетицину (G418) и проверяют на активность *lacZ*. Чтобы обеспечить повторную селекцию на основе резистентности к G418, модуль фланкируют короткими прямыми повторами, способствующими эксцизии *in vivo*.

4.6.6. Тасование плазмид

Как уже указывалось (4.6.2.), наиболее общая процедура, позволяющая получить и

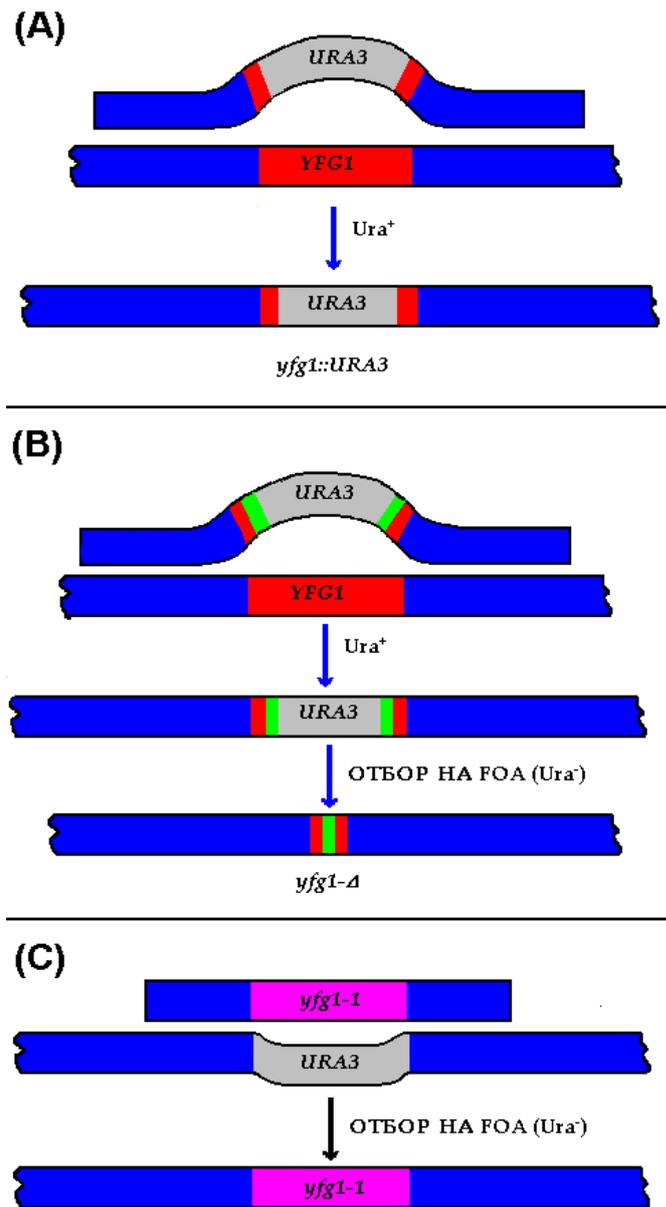


Рис. 7. Разрушение гена (gene disruption) и одноэтапное замещение гена

охарактеризовать серию измененных аллелей *yfg1-x*, состоит в том, что штамм *yfg1-Δ*, у которого изучаемый ген делегирован, трансформируют плазмидами YCp , содержащими измененные формы, и определяют фенотипы трансформантов *yfg1-Δ* [*yfg1-x*]. Однако в том случае, когда изучаемый ген является жизненно важным, возникают дополнительные технические трудности из-за того, что клетки *yfg1-Δ* будут нежизнеспособны, равно как и клетки с нефункциональными аллелями *yfg1-x*.

Можно, конечно, использовать двухэтапное замещение гена (4.6.2.) и извлекать условно летальные мутации *yfg1-x*, но наряду с этим существует метод, позволяющий более отчетливо выявлять природу мутаций *yfg1-x*. Эта процедура называется тасованием плазмид (рис. 8).

Сначала получают гаплоидный штамм, клетки которого содержат плазмиду YCp с генами URA3^+ и YFG1^+ , а хромосомные копии гена YFG1^+ у них делегированы или разрушены (*yfg1-Δ*). Такой штамм можно получить трансформацией гемизиготы ($\text{YFG1}^+/\text{yfg1-}\Delta$) и последующим отбором подходящего митотического сегреганта, сохранившего плазмиду.

Ген YFG1^+ на плазмиде YCp-LEU2 , например, подвергают мутагенезу, далее полученные плазмиды $\text{p}[yfg1-x \text{ LEU2}]$, содержащие измененные аллели *yfg1-x*, вводят в клетки штамма *yfg1-Δ* $\text{p}[\text{YFG1 URA3}]$ посредством трансформации. Для определения природы мутации *yfg1-x* можно использовать среду с FOA. Если аллель *yfg1-x* не изменен или полностью функционален, клетки могут терять плазмиду $\text{p}[\text{YFG1 URA3}]$ и оставаться жизнеспособными, приобретая при этом резистентность к FOA. С другой стороны, если аллель *yfg1-x* полностью нефункционален, штамм не будет расти на среде с FOA. Если аллель *yfg1-x* условно летален, например температурочувствителен, то и рост штамма на FOA будет наблюдаться только в соответствующих условиях, например будет температурочувствительным. Конкретно, скажем, на среде с

FOA такой штамм будет расти при 22°C, но не будет расти при 37°C, тогда как на обычной среде YEPD без FOA штамм растет при обеих температурах..

Главный недостаток описанной процедуры, а также других процедур, использующих векторы YCr, состоит в том, что копияность плазмиды варьирует от 1 до 3 или даже большей величины. Поэтому уровень экспрессии изучаемого измененного гена может варьировать, соответственно может варьировать и мутантный фенотип. Сверхэкспрессия некоторых измененных аллелей может обеспечить практически нормальный фенотип, тогда как при наличии единственной копии мутантного гена в клетке она имеет недвусмысленно мутантный фенотип. Для более точной оценки характеристик мутантного аллеля может потребоваться его однокопийная интеграция в хромосому с помощью плазмиды YIp.

Разработаны несколько вариаций перетасовки плазмиды, которые используют продукцию красного пигмента, определяемую адениновыми мутациями. Клетки с мутацией в локусе *ADE2* (например, *ade2-1*) аккумулируют красный пигмент и образуют красные колонии. Однако, если такой штамм одновременно несет делецию *ade3-Δ*, то биосинтез аденина блокируется на более ранней стадии, чем та, которая контролируется геном *ADE2*. Соответственно, колонии двойного мутанта будут белыми. Если двойной мутант несет плазмиду $p[ADE3^+ YFG1^+]$, то его колонии будут красными, а потеря плазмиды будет приводить к образованию белых секторов. При использовании такой процедуры, во-первых, отпадает необходимость использовать FOA, который довольно дорог, во-вторых, не нужно заниматься перепечаткой колоний и можно обнаруживать редкие события. Совершенства, впрочем, нет ни в чем: помимо *ade3-Δ*, другие мутации, например дыхательные, также могут блокировать пигментацию, так что доля ложных позитивных клонов оказывается довольно велика.

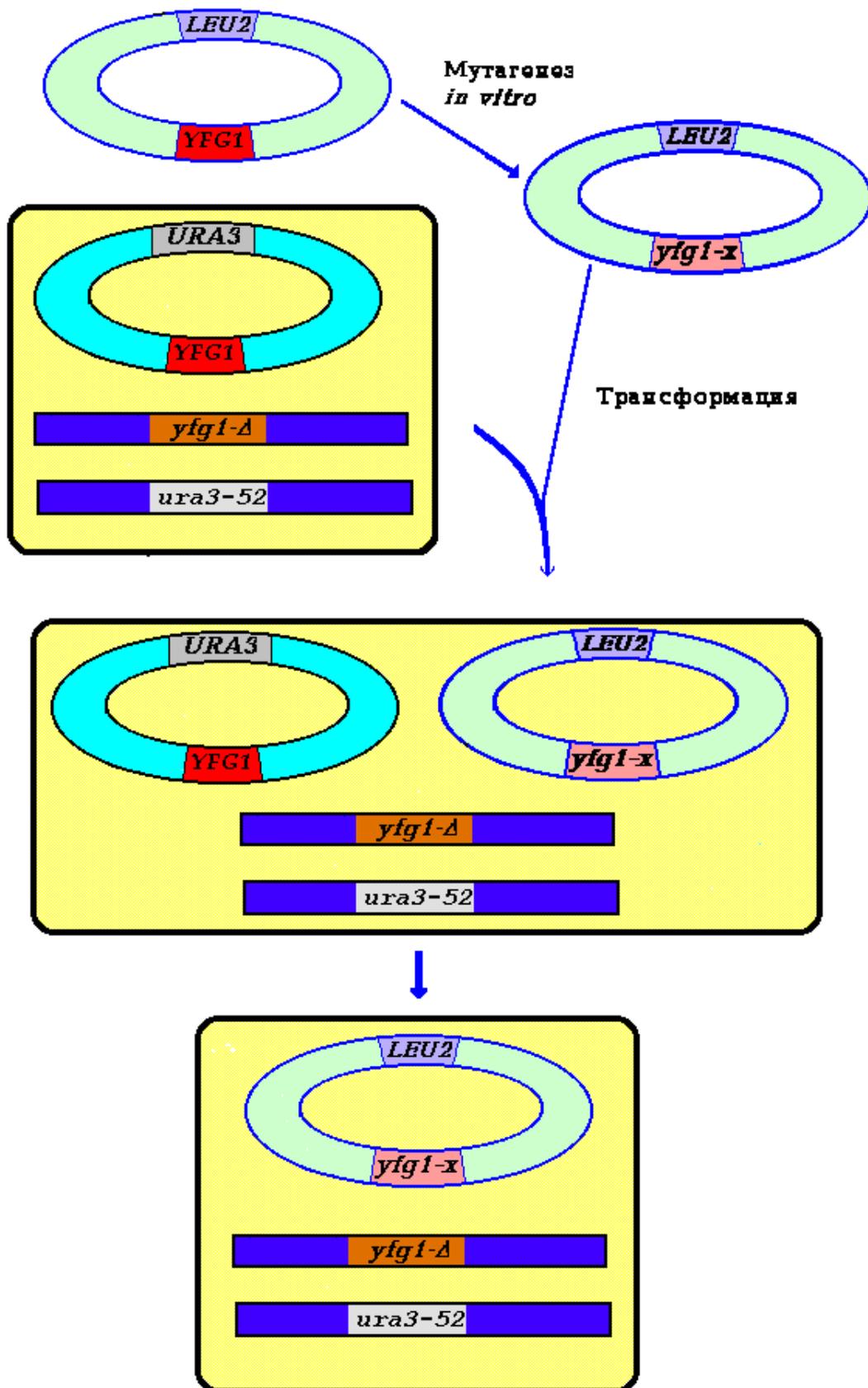


Рис. 8. Тасование плазмид (plasmid shuffle)

5. Дрожжи как стандартная аналитическая система

В монографии не будут затронуты анализ взаимодействия генов и анализ генома дрожжей. В заключение рассмотрим использование дрожжей как стандартной системы для решения некоторых специальных задач.

5.1. Дигибридная система

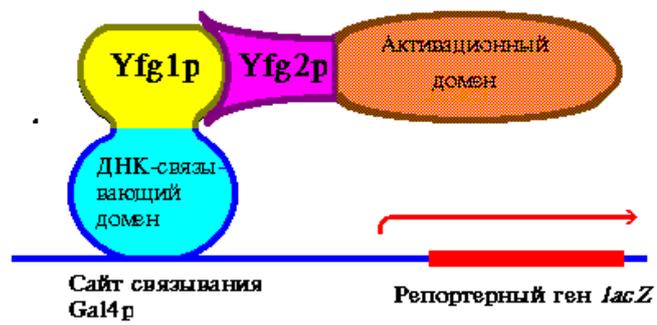
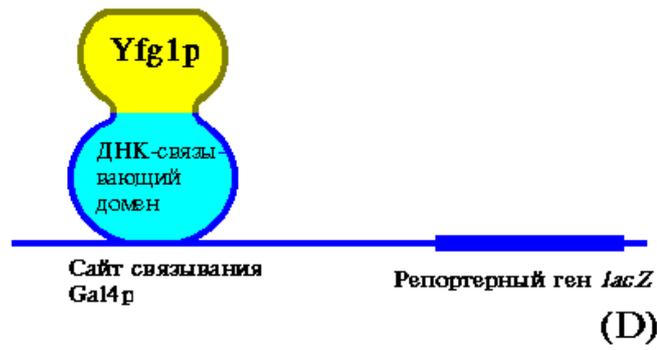
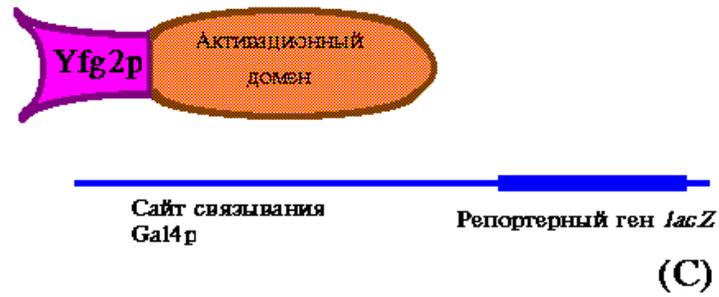
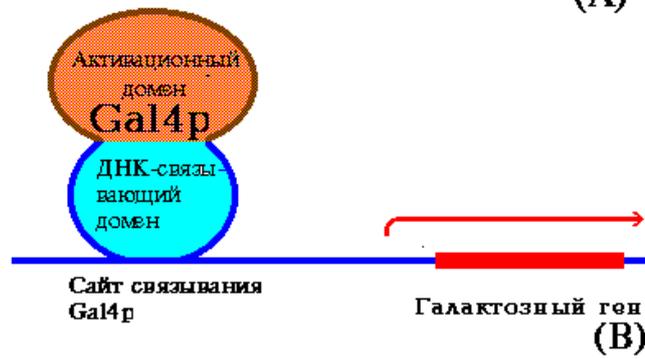
Дигибридные системы служат основой мощного метода поиска и анализа белок-белковых взаимодействий. Некоторые дигибридные системы основаны на использовании свойств определенных эукариотических факторов транскрипции, включающих в себя отдельные домены связывания с ДНК и домены активации транскрипции. Обычно для этих целей используется фактор Gal4p дрожжей. В норме оба домена находятся в одной и той же полипептидной цепи, однако фактор транскрипции оказывается функциональным и в том случае, когда связь между доменами не является ковалентной, а опосредована белок-белковыми взаимодействиями. На практике конструируют химерные гены, которые кодируют соответствующие химерные белки. Один химерный белок состоит из белка Yfg1p, соединенного с ДНК-связывающим доменом, а второй химерный белок включает в себя домен, активирующий транскрипцию, и белок Yfg2p. (рис. 9). Взаимодействия между Yfg1p и Yfg2p приводят активационный и ДНК-связывающий домены в непосредственную близость, что влечет за собой экспрессию репортерного гена, регулируемого фактором транскрипции. Другая дигибридная система использует белок-репрессор *lexA* и последовательности оператора *lexA* кишечной палочки. Обычно для проведения дигибридного анализа используют клетки дрожжей, но клетки млекопитающих также были использованы.

Имеются плазмидные векторы дрожжей, которые содержат по отдельности фрагменты ДНК, кодирующие ДНК-связывающий домен Gal4p и

его активационный домен, а также подходящие сайты рестрикции и селективные маркеры. Такие плазмиды используют вместе с репортерными штаммами дрожжей, у которых вышележащая активационная последовательность области *GAL1-GAL10* используется для активации транскрипции гена *lacZ E. coli*. Получают химерные гены, в которых частичные или полные последовательности, кодирующие изучаемые белки, синфазно сшиты с последовательностями *GAL4*, кодирующими ДНК-связывающий и активационный домены Gal4p. Если соответствующие химерные белки взаимодействуют, то репортерный ген *lacZ* будет транскрибироваться, и на среде с хромогенным субстратом X-gal будут расти голубые колонии. Имеются также штаммы дрожжей, содержащие не только репортерный ген $P_{GAL1-lacZ}$, но также репортерный ген $P_{GAL1-HIS3}$. При их использовании можно осуществлять сначала прямую селекцию на экспрессию репортерного *HIS3*, а потом проводить скрининг на экспрессию *lacZ*. Такой прием, по всей вероятности, должен обеспечивать снижение частоты ложных позитивных клонов.

В другой версии дигибридной системы используется операторная последовательность *lexA* и ДНК-связывающий домен белка-репрессора *lexA E. coli*. Активационным доменом здесь служит кислый пептид, кодируемый сегментом ДНК *E. coli*, и приобретающий способность активировать транскрипцию в клетках дрожжей после сшивания с ДНК-связывающим доменом. Химерные белки дигибридных систем должны также содержать сигналы ядерной локализации. В репортерных штаммах дрожжей под *lex*-операторную последовательность подстраивают ген *lacZ E. coli* или ген *LEU2* дрожжей.

(A)



Предусматривают также возможность обнаруживать экспрессию химерных белков иммунологическими методами, для чего эти белки метят эпитопами. При дигибридном анализе возможно, конечно, появление ложных позитивных, как и ложных негативных, клонов, однако метод позволил обнаружить значительное количество реальных межбелковых взаимодействий и по этой причине приобрел широкую популярность.

Метод весьма чувствителен и позволяет обнаруживать взаимодействия, характеризующиеся невысоким сродством. Понятно также, что можно конструировать библиотеки химерных генов и осуществлять дигибридный скрининг с целью выявления генов, взаимодействующих с определенным изучаемым геном.

Дигибридная система была использована главным образом в трех основных направлениях: во-первых, для проверки тех белков, относительно которых взаимодействие можно было предполагать, исходя из других критериев; во-вторых для выявления белковых доменов или отдельных аминокислотных остатков, играющих критическую роль в уже известных межбелковых взаимодействиях, и, в третьих, как только что говорилось, для поиска взаимодействующих белков посредством скрининга библиотек. Дигибридная система успешно использована для идентификации различных комплектов взаимодействующих белков как дрожжей, так и клеток млекопитающих; особенно эффективно ее использовали для изучения онкогенов, супрессоров опухолей, протеинкиназ, регуляции клеточного цикла. Например, с помощью дигибридной системы обнаружены взаимодействия белков Jun и Fos; Ras и протеинкиназы Raf; p53 и большого Т-антигена вируса SV40 и др. взаимодействия онкопротеинов [69, с. 791-797].

5.2. Искусственные хромосомы дрожжей

Начальный этап изучения эукариотических геномов на молекулярном уровне обычно предполагает клонирование протяженных фрагментов хромосом. С этой целью геномную ДНК расщепляют эндонуклеазами рестрикции и лигируют со специально созданными для клонирования векторами. Обычно фрагменты длиной 100-200 т.п.н клонируют в бактериальных искусственных хромосомах (ВАС), а для клонирования фрагментов длиной 200-800 т.п.н. используют искусственные хромосомы дрожжей (УАС). Как следует из последнего названия, соответствующие рекомбинантные структуры способны поддерживаться в клетках дрожжей, но этим их значение не исчерпывается. Разработаны методы переноса УАС в культивируемые эукариотические клетки, а также в клетки зародышевой линии экспериментальных животных [70, с. 67-69].

Рис. 10 иллюстрирует один из конкретных вариантов конструирования т.н. УАС-клонотеки. Кольцевой вектор pУАС4, способен реплицироваться в клетках *E. coli* и, подобно векторам УСр, содержит элементы *ARS* и *CEN*. Кроме того, он содержит маркерные гены *TRP1* и *URA3*, а также ген *HIS3*, фланкированный инвертированным повтором теломерной последовательности инфузории *Tetrahymena*, и ген-супрессор *SUP4-o*. В нуклеотидной последовательности этого гена присутствует сайт рестрикции *EcoRI*.

Вектор сначала амплифицируют в бактериальных клетках, затем расщепляют рестриктазой *Bam HI*. При этом вырезается ген *HIS3* и получается линейная конструкция с элементами *ARS* и *CEN*, селективными маркерами и теломерными последовательностями на концах. Такая линейная структура (линейная минихромосома) может эффективно трансформировать дрожжевые клетки, но трансформанты получаются нестабильные. Несмотря на присутствие в минихромосомах элемента *CEN*, они мультикопийны и теряются с высокой частотой. По всей вероятности, высокая частота их потери обусловлена малыми

размерами; во всяком случае, увеличение размеров линейных минихромосом сопровождается повышением их стабильности, а также снижением копийности до величины, близкой к единице.

Для увеличения размеров линейной минихромосомы можно, как показано на рис. 10, разрезать ее по сайту EcoRI, обработать фосфатазой, смешать с EcoRI-фрагментами клонируемой экзогенной геномной ДНК, произвести лигирование смеси, использовать полученный препарат для трансформации штамма дрожжей с генотипом *ade2-1 ura3-52 trp1-Δ* и отобрать пигментированные клоны. Пигментация свидетельствует о разрушении гена *SUP4-0* вставкой клонируемой гетерологичной ДНК. При таком способе сборки YAC осуществляется лигированием *in vitro*.

Сборка YAC может осуществляться также в результате рекомбинации *in vivo*. Этот т.н. метод трансформационно-ассоциированной рекомбинации (ТАR) иллюстрирует рисунок 11. Искусственная хромосома дрожжей с клонированным фрагментом гетерологичной ДНК, например ДНК человека, "конструируется" *in vivo* за счет актов гомологичной рекомбинации между повторяющимися элементами ДНК человека (например, последовательностями Alu) и теми же повторами, включенными в состав вектора.

Для клонирования таким методом используют векторы, которые образуют в процессе трансформации линейные и кольцевые YAC. Для получения линейных YAC трансформацию сферопластов дрожжей проводят одновременно тремя видами ДНК: клонируемой ДНК и ДНК двух линейризованных векторных плазмид – плечей YAC. Рекомбинация между Alu последовательностями на фланге каждого из плеч и геномной ДНК приводит к образованию линейного YAC, регулярную сегрегацию которого обеспечивает центромера.

Образование линейного YAC может происходить и с участием только одного центромерного вектора. Очевидно, что такой "полу-YAC" может реплицироваться и стабильно поддерживаться в клетке только в том случае,

если клонированный фрагмент содержит на конце теломеру или теломероподобную последовательность.

Клонирование ДНК с помощью вектора, не содержащего ни одной теломеры, приводит к образованию кольцевого YAC. В линейизованном виде такой вектор включает центромеру, дрожжевой селективный маркер *HIS3*, а оба конца фланкированы *Alu* повторами. Рекомбинация между *Alu* последовательностями концов вектора и ДНК человека приводит к замыканию кольца.

Характерной особенностью TAR-векторов является отсутствие в их составе ARS-элемента, обеспечивающего репликацию векторов в клетках дрожжей. Известно, что в геноме человека ARS-подобные последовательности расположены достаточно часто (в среднем 1 на 30-40 т.п.). Следовательно, протяженные фрагменты ДНК человека, клонированные в YAC, должны обладать ARS-активностью в клетках дрожжей.

Искусственные хромосомы дрожжей не только служат инструментом клонирования, но также могут использоваться для манипуляций с клонированными последовательностями. Например, в клонированную последовательность можно встроить селективный маркер посредством рекомбинации между YAC и кольцевой плазмидой дрожжей. Можно также осуществлять рекомбинацию между перекрывающимися различными YAC и получать укрупненные клоны, содержащие в себе более протяженные области клонированной ДНК. Созданы специальные YAC, позволяющие получать терминальные и внутренние делеции в клонированных вставках ДНК.

Искусственные хромосомы дрожжей использованы для клонирования не только генов, но также теломерных и центромерных областей геномов млекопитающих и хромосомных ориджинов репликации [71, с. 1457-1470].

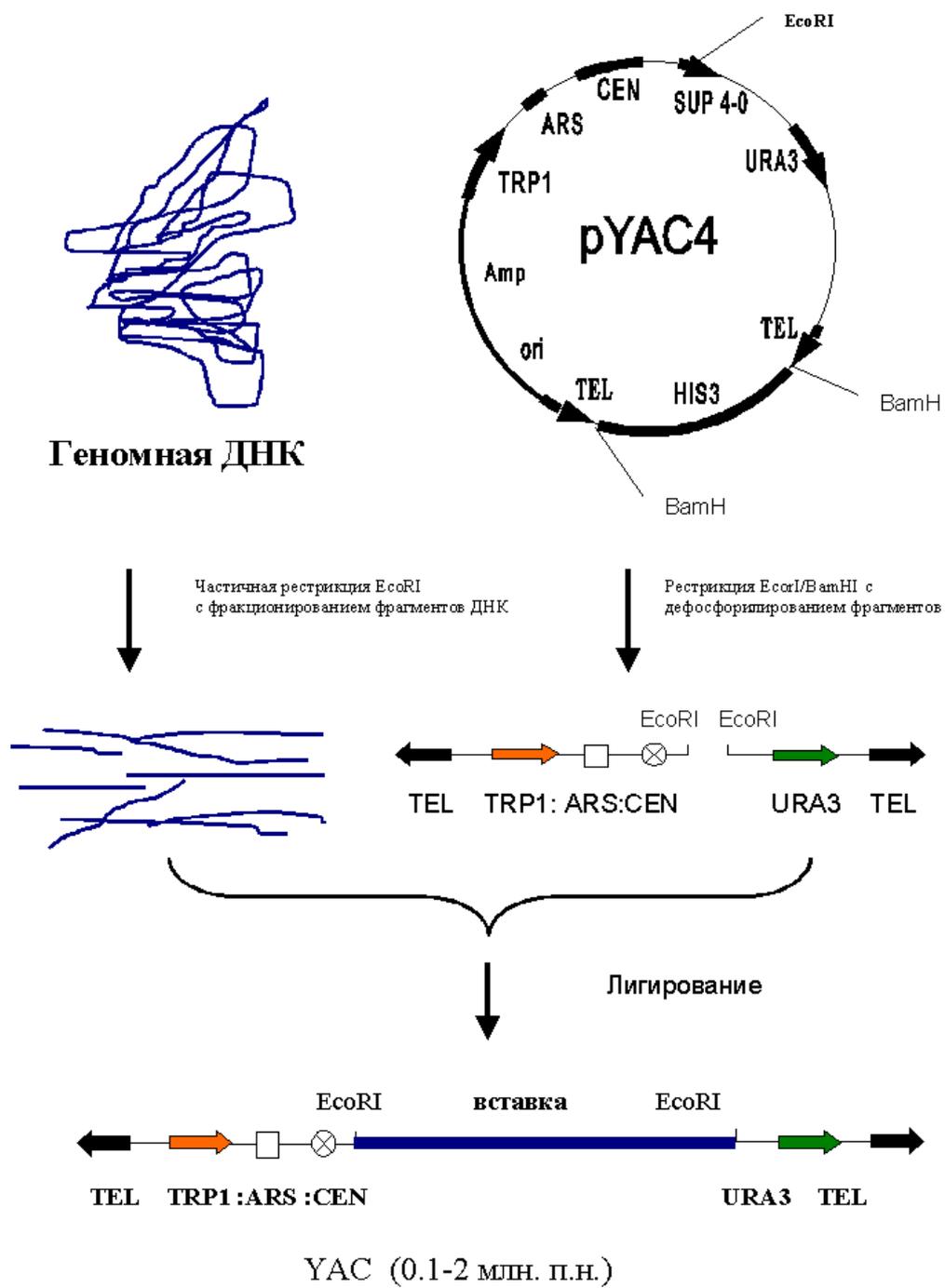


Рис. 10. Схема конструирования YAC *in vitro*

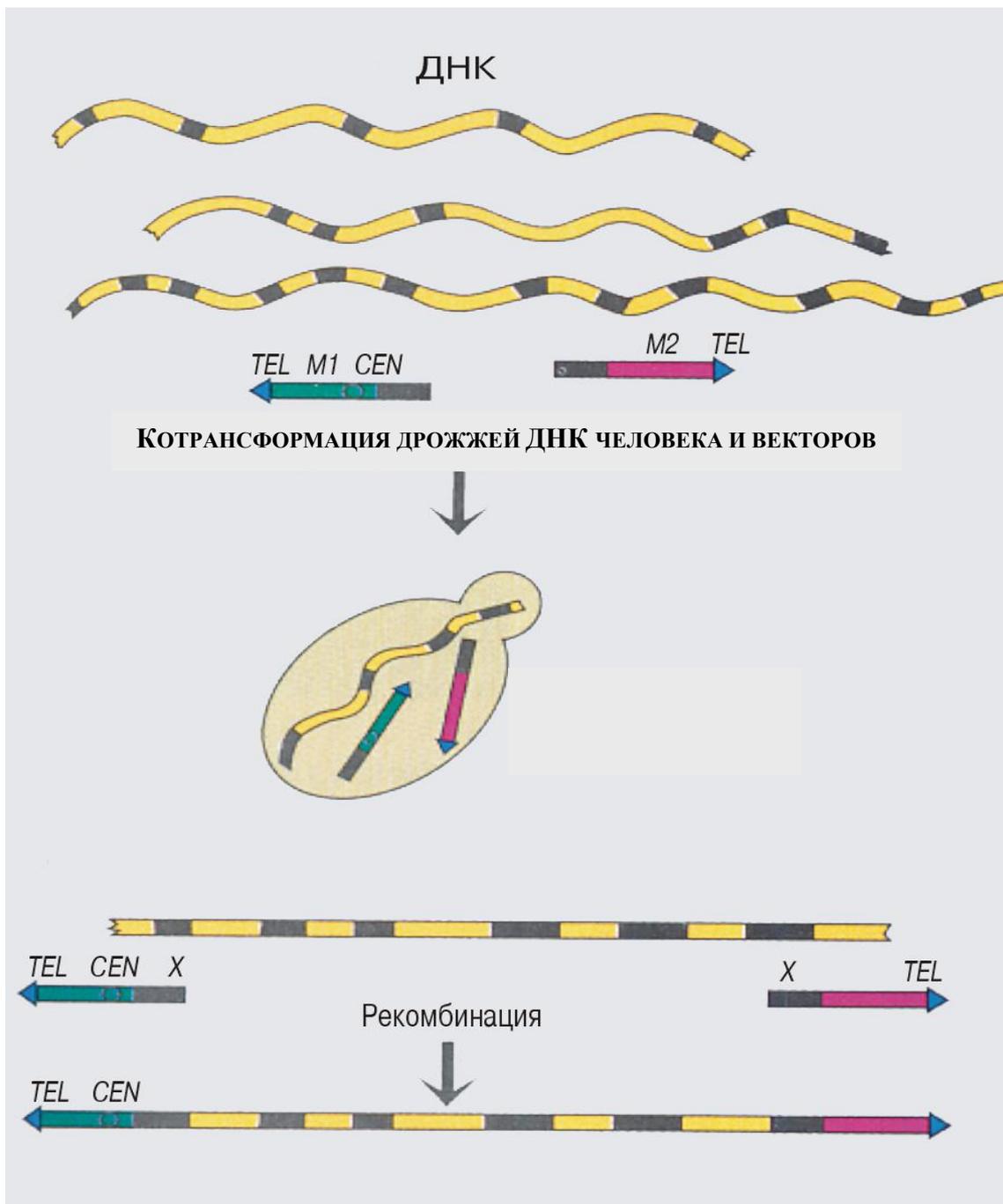


Рис. 11. Схема конструирования YAC *in vivo*

5.3. Экспрессия генов гетерологичных белков в клетках дрожжей

До сих пор наиболее интенсивно в качестве хозяйских клеток для т.н. гетерологичной экспрессии используются клетки *Escherichia coli*. Однако и дрожжи в этом качестве обладают несомненной привлекательностью. Белки, синтезированные в клетках дрожжей, в отличие от бактериальных продуктов, не содержат эндотоксинов. В некоторых случаях, например в случае корового (core) антигена вируса гепатита В, дрожжевой продукт, по сравнению с бактериальным, обладает более высокой активностью. Дрожжи располагают также некоторыми механизмами посттрансляционного процессинга (сборка частиц, аминотерминальное ацетилирование, миристилирование, протеолитический процессинг), которые отсутствуют у *E. coli*. Эти механизмы позволили в ряде случаев получить белки человека, или белки, ассоциированные с патогеном человека, с соответствующими аутентичными модификациями. В дополнение к этому, гетерологичные белки, секретлируемые специально сконструированными штаммами дрожжей, корректно разрезаются и складываются, а также легко извлекаются из культуры дрожжей. Использование гомологичных или гетерологичных сигнальных пептидов способно обеспечивать аутентичное созревание секретлируемых продуктов при действии эндогенного аппарата дрожжей.

Важность дрожжей как хозяйских клеток при получении белковых продуктов методами рекомбинантных ДНК иллюстрирует тот факт, что первая прошедшая апробацию вакцина для человека, а именно коровый антиген вируса гепатита В, и первый пищевой продукт, реннин, были получены именно в дрожжевой системе.

Многочисленные разновидности экспрессионных векторов, доступные к настоящему времени, представляют собой производные векторов Yip, YEp и YCr, о которых шла речь в первой лекции. В векторы встраивают кДНК, синтетическую ДНК или геномную ДНК, не содержащую интронов.

Промоторы, используемые в экспрессионных векторах, содержат сайт инициации транскрипции и различной величины последовательности некодирующих 5'-областей. Многие векторы не содержат в транскрибируемой области промотора сайт АТG, этот сайт должен быть корректно предоставлен экспрессируемой гетерологичной последовательностью. Сайт терминации транскрипции содержат многие экспрессионные векторы, но не все. При отсутствии этого сайта в векторе транскрипция будет продолжаться до терминирующего сигнала, имеющегося в следующем гене или по счастливой случайности присутствующего в межгенной области.

Наиболее часто в экспрессионных векторах дрожжей используются промоторы генов алкогольдегидрогеназы I, енолазы, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы, фосфоглицераткиназы, триозофосфатизомеразы, галактокиназы (P_{GALI}), репрессибельной кислой фосфатазы, α -феромона и пр. Эти промоторы всегда обеспечивают высокий уровень транскрипции гетерологичных генов, но количество получаемого в конечном счете белка для разных генов сильно варьирует [72, с. 1607-1618].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Современная классификация дрожжей рода *Saccharomyces* находится в полном соответствии с биологической концепцией вида, разработанной Dobzhanski (1937) и Мауг (1942) на высших эукариотах. Имея одинаковую систему типов спаривания, семь биологических видов *Saccharomyces* могут скрещиваться между собой в любых комбинациях, однако образующиеся гибриды стерильны. Внутривидовые гибриды, наоборот, высокофертильны и характеризуются регулярным мейотическим расщеплением контрольных маркеров. В случае двух разновидностей *S. bayanus* (var. *bayanus* и var. *tivarum*) и географических популяций *S. paradoxus* наблюдается пониженная выживаемость гибридных аскоспор (Naumov et al., 1997a, 2000; Naumova et al., 2005).

Проведенный в данной работе молекулярный анализ, включая ДНК-ДНК реассоциацию, установил близкое генетическое родство дрожжей *S. paradoxus* и *S. cariocanus*. Несмотря на 98%-ную ДНК-ДНК реассоциацию этих видов и сходство по многим молекулярным маркерам штаммов *S. cariocanus* и североамериканских изолятов *S. paradoxus*, образуемые ими гибриды полностью стерильны (Naumov et al., 2000a). С генетической точки зрения *S. cariocanus* является самостоятельным биологическим видом. Похожая ситуация была отмечена при сравнении нуклеотидных последовательностей ДНК человека и шимпанзе, полноразмерные геномы которых отличаются только 1.23% нуклеотидных замен (Li, Saunders, 2005). Сравнительная геномная гибридизация на микрочипах выявила большое сходство геномов человека, шимпанзе и гориллы (Wilson et. al., 2007). В геноме человека было идентифицировано 63 сегмента с увеличенным числом копий генов. Идентифицированные области в геноме человека, по-видимому, были дублированы сравнительно недавно, что способствовало расхождению геномов человека и шимпанзе, которое произошло около 6 миллионов лет назад (Wilson et. al., 2007). Дрожжи *S. cerevisiae*

дивергировали от предка *S. paradoxus/S. cariocanus* около 5-10 миллионов лет назад (Kellis et al., 2003). Последние два вида разошлись значительно позднее, и, при этом, могло иметь место симпатрическое видообразование. На растениях показано, что при симпатрическом видообразовании отбор обычно направлен на расхождение видов и их изоляцию за счет формирования значительных различий по небольшому числу генетических локусов (Savolainen et al., 2006). В отличие от остальных видов *Saccharomyces*, дрожжи *S. cariocanus* характеризуются специфичным молекулярным кариотипом с наибольшим числом реципрокных транслокаций, затрагивающих 8 из 16 хромосом (IX/XV, II/XVI, XI/IV и XII/XIV), и обладают уникальной нуклеотидной заменой в 191 позиции консервативного гена 18S рРНК. В то же время по многим локусам *S. cariocanus* не отличается от штаммов *S. paradoxus* североамериканского происхождения. В свою очередь штаммы *S. paradoxus* различного географического происхождения имеют идентичные последовательности гена 18S рРНК и сходные молекулярные кариотипы. Обнаруженные нами различия между европейской, дальневосточной и североамериканской популяциями *S. paradoxus* затрагивают более вариабельные районы рРНК (домен D1/D2 и ITS1 участок), а также митохондриальный ген АТР9. Дрожжи *S. paradoxus* из трех географически отдаленных регионов мира частично генетически изолированы и, по-видимому, находятся на ранних стадиях аллопатрического видообразования (Naumov et al., 1997b, 2000a). При аллопатрическом видообразовании различия накапливаются равномерно по всему геному, так как «специальный» отбор на расхождение отсутствует (Savolainen et al., 2006). Проведенный нами гибридологический анализ штаммов *S. paradoxus* различного происхождения подтвердил их частичную репродуктивную изоляцию и выявил достаточно условную роль крупных хромосомных перестроек в репродуктивной изоляции биологических видов *Saccharomyces*.

Молекулярный анализ штаммов *S. bayanus*, *S. cerevisiae* и *S. paradoxus* различного происхождения свидетельствует о значительном внутривидовом полиморфизме этих дрожжей. У дрожжей *S. cerevisiae* и *S. bayanus* var. *ivarum* обнаружена корреляция между микросателлитными маркерами штаммов и их происхождением (местом и источником выделения). Дрожжи *S. paradoxus* характеризуются менее полиморфными (ОТО)5-профилями.

Впервые изучено распространение и особенности плазмидных днРНК у видов рода *Saccharomyces*. Всего идентифицировано 11 типов М-днРНК, включая фракции М5-М7 и М8-Ми, специфичные, соответственно для *S. paradoxus* и *S. bayanus*. Плазмидные днРНК не обнаружены только у *S. cariocanus*. Фракция Мi встречается у 4 видов *Saccharomyces*: *S. bayanus*, *S. cerevisiae*, *S. paradoxus* и *S. kudriavzevii*, а фракция М2 не обнаружена только у *S. cariocanus* и *S. kudriavzevii*. Известно, что у дрожжей *S. cerevisiae* различные по размеру фракции Мi и детерминируют образование разных токсинов и разную устойчивость к ним (Wickner, 1996). Все обнаруженные плазмидные М-днРНК не функциональны и, возможно, являются мутантными формами киллерных плазмид. На примере дрожжей *S. cerevisiae* хорошо известно, что под влиянием различных физических и химических факторов (повышенная температура, УФ облучение, акридиновые красители и циклогексимид) может происходить элиминация киллерных плазмид (Наумова, Наумов, 1974). Очевидно, что и в природе у дрожжей *Saccharomyces* происходят мутации в плазмидных днРНК или их полная элиминация под воздействием различных факторов окружающей среды.

Последним достижением сравнительной геномики дрожжей *Saccharomyces* является обнаружение среди культурных штаммов естественных межвидовых гибридов различного типа: *S. cerevisiae* x *S. bayanus*, *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* и *S. cerevisiae* x *S. bayanus* x *S. kudriavzevii*. Формирование межвидовых гибридов является одним из механизмов адаптации дрожжей в промышленных ферментациях, так как гибриды лучше приспособлены к

изменяющимся условиям окружающей среды, чем родительские штаммы. Проведенный нами молекулярный анализ штаммов *Saccharomyces* различного происхождения позволил обнаружить межвидовые гибриды *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* американского происхождения. Согласно сравнительной геномной гибридизации на микрочипах обнаруженные нами гибриды имеют другую композицию генома, чем межвидовые гибриды *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* европейского происхождения. Для европейских гибридов характерно сохранение полного генома дрожжей *S. cerevisiae* и частичного *S. kudriavzevii* (Gonzales et al., 2006, 2008). Изученные нами гибридные штаммы NRRL Y-53 и NRRL Y-1912, наоборот, обладают более полным геномом *S. kudriavzevii* и частичным *S. cerevisiae*. Несмотря на различное происхождение этих штаммов, у них обнаружены общие участки амплификации и пониженной копийности. Следует отметить, что гибридный штамм NRRL Y-53 выделен из пчелы. Известно, что насекомые, особенно *Drosophila*, могут служить вектором распространения дрожжей (Gilbert, 1980; Begon, 1986). До этого из дрозофилы были выделены дрожжи *S. cerevisiae*, *S. bayanus*, *S. paradoxus* и *S. cariocanus*, однако, межвидовой гибриды обнаружены впервые. В пищеварительном тракте насекомых происходит переваривание оболочек асков и высвобождение спор дрожжей, что может способствовать гибридизации спор и образованию как внутри-так и межвидовых гибридов *Saccharomyces* (Reuter et al., 2007).

С помощью сравнительной геномной гибридизации обнаружена интрогрессия субтеломерных последовательностей *S. bayanus* var. *ivarum* в геном штаммов *S. cerevisiae*, изолированных с ягод черной смородины Харьковской области (Украина). В случае интрогрессии, при межвидовой гибридизации образуются гибриды F1, способные к возвратным скрещиваниям с одним из родителей. По-видимому, предок штаммов ГСЧ-5, ГСЧ-8 и ГСЧ-11 возник путем редких выживших аскоспор гибрида *S. cerevisiae* x *S. bayanus* var. *ivarum* и возможно имел более полный геном *S.*

cerevisiae. Затем он подвергся возвратным скрещиваниям с *S. cerevisiae*, сохранив в своем геноме только отдельные последовательности *S. bayanus* var. *ivarum*.

Полученные результаты показали, что с помощью рестриктазного анализа некодирующих участков рДНК (ITS1 и IGS2) и молекулярного кариотипирования можно не только дифференцировать дрожжи *S. cerevisiae*, *S. bayanus* и *S. kudriavzevii*, но и обнаруживать их межвидовые гибриды. В свою очередь с помощью сравнительной геномной гибридизации можно определять соотношение родительских геномов у гибридных штаммов и выявлять интрогрессивные последовательности ДНК в геномах биологических видов *Saccharomyces*.

ВЫВОДЫ

1. Впервые достоверно определены значения ДНК-ДНК-реассоциации дрожжей *S. cariocanus*, *S. kudriavzevii*, *S. mikatae* между собой и с типовыми культурами *S. cerevisiae*, *S. bayanus* и *S. paradoxus*.
2. Подтверждено близкое генетическое родство дрожжей *S. paradoxus* и *S. cariocanus*. Результаты молекулярного анализа хорошо согласуются с ранее полученными генетическими данными (Naumov et al., 2000) и указывают на видовой статус дрожжей *S. cariocanus*.
3. Гибридологический анализ штаммов *S. paradoxus* различного географического происхождения, не имеющих хромосомных транслокаций, выявил достаточно условную роль крупных хромосомных перестроек в постзиготической изоляции биологических видов *Saccharomyces*. Подтвержден' сложный состав вида *S. paradoxus*, включающего частично изолированные географические популяции.

4. Выявлен значительный внутривидовой полиморфизм дрожжей *S. cerevisiae*, *S. bayanus* и *S. paradoxus*. Обнаружена корреляция между (ОТС)5-профилями и происхождением штаммов.
5. Впервые проведен скрининг вирусных днРНК и изучен их полиморфизм у дрожжей биологических видов *S. bayanus*, *S. cariocanus*, *S. kudriavzevii*, *S. mikatae* и *S. paradoxus*. Всего идентифицировано 11 различных типов М-днРНК. Все описанные плазмидные М-днРНК не функциональны и, возможно, являются мутантными формами киллерных плазмид.
6. Впервые обнаружены три межвидовых гибрида *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* американского происхождения и изучена композиция их геномов с помощью сравнительной геномной гибридизации на микрочипах разного типа.
7. Установлено, что у гибридных геномов произошли значительные хромосомные перестройки: дубликации отдельных генов и участков хромосом, образование химерных хромосом за счет нереципрокной рекомбинации гомеологичных хромосом.
8. Значительные изменения у гибридных штаммов обнаружены в теломерных участках хромосом, наиболее пластичной части генома, обеспечивающей приспособляемость дрожжей к различным условиям среды.

Список использованной литературы

1. Айала Ф., Кайгер Дж. Современная генетика. М.: Мир, 1988. (в 3-х т.), с. 111-123
2. Бачинская А.А. История развития и культуры нового дрожжевого грибка, с. 83-84
3. *Saccharomyces paradoxus* //Журн. микробиол. 1914. Т. 1. № 3/5. С. 231-247.
4. Грант В. Видообразование у растений. М.: изд-во «Мир». 1984., с. 69-72
5. Журавлева Г.А., Миронова Л.Н., Инге-Вечтомов С.Г. Геном дрожжей и первые шаги в постгеномную эру // Молекулярная биология. 2000. Т. 34. № 4. С. 560-571.
6. Захаров И.А., Кожин С.А., Кожина Т.Н., Федорова И.В. Сборник методик по генетике дрожжей-сахаромицетов / Л.: Изд-во Наука. 1984. 144 с.
7. Зехнов А.М., Соом Я.О., Нестерова Г.Ф. Новый тип антагонистической активности дрожжей сахаромицетов и характер его наследования // Генетика. 1989. Т. 25. №8. С. 1364-1370.
8. Казанцева Д. И., Зимина М. С. Штаммы-киллеры дрожжей с широким спектром действия: поиск среди коллекционных штаммов и предварительная классификация //Микробиология. 1989. Т. 58. Вып. 2. С. 291-297.
9. Колесник И.М., Жолудева М.В., Мартыиенко Н.Н., Грачева И.М. Новые штаммы для плодово-ягодного виноделия. Сахаромицеты из ягод черной смородины Западной Беларуси // Виноделие и Виноградарство. 2004. № 3. С. 15-17.
10. Кудрявцев В.И. Систематика дрожжей. М.: Изд-во АН СССР. 1954. 427с.
11. Молекулярная клиническая диагностика. Методы, под ред. С. Херрингтона и Дж. Макги. М.: Изд-во "Мир". 1999. 558с.
12. Н.Наумов Г.И. Сравнительная генетика дрожжей. Сообщение XIV. Анализ винных штаммов *Saccharomyces*, нейтральных к штамму-убийце типа к2 // Генетика. 1974. Т. 9. № 1. С. 130-136.
13. Наумов Г.И. Сравнительная генетика дрожжей. Сообщение XXVIII. Необычное наследование токсинообразования у *Saccharomyces paradoxus* Batschinskaia // Генетика. 1985. Т. 21. № 12. С. 1794-1798.
14. Наумов Г.И. Генетическая дифференциация и экология дрожжей *Saccharomyces paradoxus* Batschinskaia // ДАН. 1986. Т. 291. №3. С. 754-757.
15. И.Наумов Г. И. Дифференциация генофонда культурных дрожжей *Saccharomyces*: восемь групп культиваров. // Докл. Акад. Наук. 1989. Т. 306. № 5. С. 1253-1255.

16. Наумов Г.И. Естественное разнообразие дрожжей неисчерпаемый генофонд для фундаментальных и прикладных разработок // Успехи совр. биол. 1997. Т. 117. вып. 2. С. 185-195.
17. Наумов Г.И. Дивергентная популяция дрожжей *Saccharomyces paradoxus* на Гавайях: вид *in statu nascendi* // ДАН. 1999. Т. 364. №2. С. 281-283.
18. Наумов Г.И. Новая разновидность *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* comb. nov., установленная генетическим анализом // Микробиология. 2000. Т. 69. №3. С. 410-414.
19. Наумов Г.И. Гибридологический анализ нового биологического вида *Saccharomyces arboricolus* Wang et Bai // ДАН. 2009. Т. 426. №3. С. 424-426.
20. Наумов Г.И., Юркевич В.В. Изменчивость биохимических признаков, используемых в таксономии дрожжей *Saccharomyces* II Успехи совр. биол. 1970. Т. 70. вып. 3. №6. С. 315-325.
21. Наумов Г.И., Наумова Т.И. Сравнительная генетика дрожжей. Сообщение XIII. Сравнительное изучение сахаромисетов-убийц из различных коллекций // Генетика. 1973. Т. 9. №11. С. 140-145.
22. Наумов Г.И., Тюрина Л.В., Бурьян Н.И., Наумова Т.И. Виноделие -экологическая ниша сахаромисетов-убийц типа кг // Биологические науки. Научные доклады высшей школы. 1973. №7. С. 103-107.
23. Наумов Г.И., Наумова Т.И. Сравнительная генетика дрожжей. Сообщение XVII. Новый тип штамма-убийцы у дрожжей-сахаромисетов // Генетика. 1978. Т. 14. №1. С. 138-144.
24. Наумов Г.И., Кондратьева В.И., Наумова Т.И., Гудкова Н.К. Генетические основы классификации дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Изучение выживаемости аскоспор гибридов // Журнал общей биологии. 1983. Т. XLIV. №5. С. 648-660.
25. Наумов Г.И., Никоненко Т.А. Дивергенция геномов культурных и диких дрожжей *Saccharomyces sensu stricto*: четыре вида-двойника // ДАН. 1987. Т. 294. №2. С. 476-479.
26. Наумов Г.И., Никоненко Т.А. Восточная Азия — вероятная родина культурных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* II Изв. СО АН СССР. 1988. №20. вып. 3. С. 97-101.
27. Наумов Г.И., Корхола М., Наумова Е.С., Бериташвили Д.Р., Ланто Р. Молекулярное кариотипирование биологических видов *Saccharomyces cerevisiae*, *S. paradoxus* и *S. bayanus* II ДАН. 1990а. Т. 311. №5. С. 1242-1246.
28. Наумов Г.И., Наумова Е.С. *Saccharomyces douglasii* nom. nud. синоним *S. paradoxus* согласно гибридологическому анализу // ДАН. 1990b. Т. 311. №4. С. 975-977.
29. Наумов Г.И., Наумова Е.С. Дикая популяция *Saccharomyces cerevisiae* обнаруженная в Сибири // Микробиология. 1991. Т. 60. вып. 3. С. 537-540.
30. Наумов Г.И., Калеро Ф., Наумова Е.С., Санчо Э. Генетическая характеристика испанских хересных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* из района Монтийя-Морилес // Биотехнология. 1994. № 8. С. 11-13.

31. Наумов Г. И., Газдиев Д. О., Наумова Е. С. // Обнаружение биологического вида *Saccharomyces bayanus* в дальневосточной Азии // Микробиология. 2003. Т. 72. №6. С. 834-839.
32. Наумов Г.И., Наумова Е.С., Кондратьева В.И. Использование гибридизации в селекции эукариотических микроорганизмов // Генетика. 2006. Т. 42. № 11. С. 1571-1576.
33. Наумова Е.С., Наумов Г.И., Майклз К.А., Бериташвили Д.Р. Идентификация хромосомных ДНК у дрожжей *Saccharomyces bayanus* и *S. pastorianus* // ДАН. 1991. Т. 316. №3. С. 744-746.
34. Наумова Е.С., Наумов Г.И., Корхола М. Молекулярные кариотипы различных генетических линий дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* II Биотехнология. 1993а. №4. С. 2-5.
35. Наумова Е.С., Черноокова Т.В., Скорикова Т.К., Кондратьева В.И., Бурьян Н.И., Наумов Г.И. Селекция шампанских дрожжей на основе межвидовой гибридизации *Saccharomyces cerevisiae* x *S. bayanus* // Биотехнология. 1993b. № 7. С. 8-13.
36. Наумова Е.С., Коршунова И.В., Наумов Г.И. Молекулярный анализ α -галактозидазных генов MEL дрожжей *Saccharomyces sensu stricto* // Молекулярная биология. 2003. Т. 37. №5. С. 825-833.
37. Наумова Е.С., Жолудева М.В., Мартыненко Н.Н., Наумов Г.И. Молекулярно-генетическая дифференциация культурных дрожжей *Saccharomyces* II Микробиология. 2005. Т. 74. №2. С. 179-187.
38. Наумова Т.И., Наумов Г.И. Сравнительная генетика дрожжей. Сообщение XII. Изучение антагонистических отношений у дрожжей рода *Saccharomyces* II Генетика. 1973. Т. 9. №4. С. 85-90.
39. Наумова Т.И., Наумов Г.И. Индуцированная элиминация цитогенов убийства (к) и (кг) и цитогена нейтральности (п) дрожжей *Saccharomyces* // Биологические науки. Научные доклады высшей школы. 1974. №2. С. 108-110.
40. Нестерова Г.Ф. Киллерные системы дрожжей // Успехи Современной Биологии. 1988. Т. 105. Вып. 3. С. 374-392.
41. Нестерова Г.Ф. Фундаментальные и прикладные аспекты изучения вирусоподобных плазмид дрожжей сахаромикетов // Генетика. 1993. Т. 29. №4. С. 581-603.
42. Нестерова Г.Ф., Шабалина М.В., Миловатский В.С. Детерминация антагонистической активности типа K4 у дрожжей сахаромикетов // Генетика. 1983. Т. 19. №7. С. 1054-1059.
43. Оно С. Генетические механизмы прогрессивной эволюции. М.: Мир, 1973, 227 с.
44. Aa E., Townsend J.P., Adams R.I., Nielsen K.M., Taylor J.W. Population structure and gene evolution in *Saccharomyces cerevisiae* II FEMS Yeast Res. 2006. V.6. P. 702-715.
45. Adjiri A., Chanet R., Mezard C., Fabre F. Sequence comparison of the ARG4 chromosomal regions from the two related yeasts, *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces douglasii* II Yeast. 1994. V. 10. P. 309-317.

46. Akerlund T., Nordstorm K., Bernander R. Analysis of cell size and DNA content in exponentially growing and stationary-phase batch cultures of *Escherichia coli* II *J. Bacteriol.* 1995. V. 177. P. 6791-6797.
47. Andersen T.H., Hoffmann L., Grifone R., Nilsson-Tillgren T., Kielland-Brandt M.C. Brewing yeast genetics // In *Yeast Physiology. A New Era of Opportunity*. EBC Monograph 28. Nürnberg. Fachverlag. Hans Carl. 1999. pp. 140-147.
48. Antunovics Z., Nguyen H-V., Gaillardin C., Sipiczki M. Gradual genome stabilization by progressive reduction of the *Saccharomyces uvarum* genome in an interspecific hybrid with *Saccharomyces cerevisiae* II *FEMS Yeast Res.* 2005. V.5. P. 1141-1150.
49. Azumi M., Goto-Yamamoto N. AFLP analysis of type strains and laboratory and industrial strains of *Saccharomyces sensu stricto* and its application to phenetic clustering // *Yeast.* 2001. V. 18. P. 1145-1154.
50. Bakalinsky A.T., Snow R. The chromosomal constitution of wine strains of *Saccharomyces cerevisiae* I *Yeast.* 1990. V. 6. P. 367-382.
51. Begon M. Yeasts and *Drosophila*. In *the Genetics and Biology of Drosophila*, Volume 3b, M. Ashburner, H. Carson, J.N. Thompson eds. (London Academic press). 1986. pp 345-384.
52. Belloch C, Orlic S, Barrio E, Querol A. Fermentative stress adaptation of hybrids within the *Saccharomyces sensu stricto* complex // *Int. J. Food Microbiol.* 2008. V. 122. P. 188-195.
53. Benitez T., Martínez P., Codón A. C. Genetic constitution of industrial yeast // *Microbiología SEM.* 1996. V. 12. P. 371-384.
54. Berry E.A., Bevan E.A. A new species of double-stranded RNA from yeast // *Nature.* 1972. V. 239. P. 279-281.
55. Bicknell J.N., Douglas H.C. Nucleic acid homologies among species of *Saccharomyces* // *J. Bacteriol.* 1970. V. 101. P. 505-512.
56. Blandin G., Durrens P., Tekaija F., Aigle M., Bolotin-Fukuhara M., Bon E., Casaregola S., et al. Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: The genome of *Saccharomyces cerevisiae* revisited II *FEBS Lett.* 2000. V. 487. P. 31-36.
57. Boeke J. D., LaCrute, Fink G. R. A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in yeast; 5'-fluoro-orotic acid resistance // *Mol. Gen. Genet.* 1984. V. 197. P. 345-346.
58. Boekhout T., Theelen B., Diaz M., Fell J.W. et al. Hybrid genotypes in the pathogenic yeast *Cryptococcus neoformans* II *Microbiology.* 2001. V. 147. P. 891-907.
59. Bon E., Neuveglise C., Casaregola S., Artiguenave F., Wincker P., Aigle M., Durrens P. Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 5. *Saccharomyces hayanus* var. *uvarum* II *FEBS Lett.* 2000. V. 487. P. 37-41.
60. Bond U., Neal C., Donnelly D., James T.C. Aneuploidy and copy number breakpoints in the genome of lager yeasts mapped by microarray hybridization // *Curr. Genet.* 2004. V.6. P. 360-370.

61. Bostian K.A., Sturgeon J.A., Tipper D.J. Encapsidation of yeast killer dsRNAs: Dependence of M on L // *J. Bacteriol.* 1980. V. 143. P. 463-469.
62. Bovers M., hagen F., Kuramae E., Diaz M.R. et al. Unique hybrids between the fungal pathogens *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* II *FEMS Yeast Res.* 2006. V. 6. P. 599-607.
63. Bradbury J.E., Richards K.D., Neiderer H. A., Lee S.A., Dunbar P.R., Gardner R.C. A homozygous diploid subset of commercial wine yeast strains // *Antonie van Leeuwenhoek.* 2006: V. 89. P. 27-37.
64. Britten R. J., Pavich M., Smith J. A new method of DNA purification. *Carnegie Inst Wash Year Book* 1970. V. 68. P. 400-402.
65. Buzzini P., Martini A. Large-scale screening of selected *Candida maltosa*, *Debaryomyces hansenii* and *Pichia anomala* killer toxin activity against pathogenic yeast II *Med. Mycol.* 2001. V. 39. P. 479-482.
66. Buzzini P., Turchetti B., Vaughan-Martini A.E. The use of killer sensitivity patterns for biotyping yeast strains: the state of the art, potentialities and limitations // *FEMS Yeast Res.* 2007. V. 7. P. 749-760.
67. Byrne K.P., Wolfe K.H. The Yeast Gene Order Browser: combining curated homology and syntenic context reveals gene fate in polyploid species // *Genome Res.* 2005. V.15. P. 1456-1461.
68. Cappello M.S., Blevé G., Grieco F., Dellaglio F., Zacheo G. Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from must of grape grown in experimental vineyard // *Journal of Applied Microbiology.* 2004. V. 97. P. 1274-1280.
69. Cardinali G., Martini A. Electrophoretic karyotypes of authentic strains of the sensu stricto group of the genus *Saccharomyces* // *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1994. V. 44. P. 791-797.
70. Carrau F.M., Neirotti E., Gioia O. Stuck wine fermentations: effect of killer/sensitive yeast interactions // *J. Ferment. Bioeng.* 1993. V. 76. P. 67-69.
71. Carro D., Pina B. Genetic analysis of the karyotype instability in natural wine yeast strains // *Yeast.* 2001. V. 18. P. 1457-1470.
72. Casaregola S., Nguyen H.-V., Lapathitis G., Kotyk A., Gaillardin C. Analysis of the constitution of the beer yeast genome by PCR, sequencing and subtelomeric sequence hybridization // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2001. V. 51. P. 1607-1618.

В монографии отражен современный уровень знаний по генетике дрожжей. Изложены общие вопросы генетики и биотехнологии как науки и промышленной отрасли – генетика, популяции дрожжей, специфика и возможности различных биотехнологических процессов; охарактеризованы биологические агенты, субстраты и получаемые целевые продукты. Даны процессы получения белка одноклеточных, аминокислот, органических кислот, биополимеров с применением генетических манипуляций. Рассмотрены новейшие методы биотехнологии дрожжей – инженерная энзимология, клеточная и генетическая инженерия. Книга предназначена для студентов, аспирантов, научных работников и специалистов – микробиологов, биотехнологов, биохимиков, экологов.



Буряченко Семен Васильевич - украинский биохимик, молекулярный биолог, биотехнолог. В 2015 году окончил Харьковский национальный университет имени В. Н. Каразина, по специальности биохимия. Его научными интересами являются генноterapia наследственных заболеваний, генетическое редактирование дефектных генов. Автор 10 патентов, более 30 статей



978-3-659-97033-7