

Розвиток трансформаційних систем вектор— господар для клонування та експресії генетичного матеріалу у неконвенційних дріжджів

А. Я. Вороновський, А. А. Сибірний

Відділення регуляторних систем клітини Інституту біохімії НАН України
Вул. Драгоманова, 14—16, Львів, 290005, Україна

Розглянуто особливості конструювання систем генетичної трансформації дріжджів. Описано розвиток таких систем для окремих видів неконвенційних дріжджів. Показано фундаментальне та прикладне значення розроблених дріжджових систем вектор — господар.

Компоненти, необхідні для конструювання системи вектор — господар у дріжджів. Використання методів роботи з рекомбінантною ДНК розгортає широкі можливості дослідження різноманітних функцій об'єкта на молекулярно-генетичному рівні. Створення ефективних трансформаційних систем для клонування та експресії генів є обов'язковою складовою таких методів. Система генетичної трансформації (або трансформаційна система вектор — господар) передбачає наявність «господаря» — реципієнтного штама мікроорганізму і «вектора» — засобу введення та вираження певного спадкового матеріалу. При конструюванні системи генетичної трансформації дріжджів першим і часто найважчим кроком є ідентифікація стійкого селективного маркера, тобто такого гена, що надає певну фенотипічну ознаку клітині. Така ознака дає можливість забезпечити цій клітині селективний ріст і таким чином ідентифікувати її серед великої кількості непротрансформованих клітин. Для трансформації дріжджів описано два типи селективних маркерів. Перший — комплементарний маркер. Це біосинтетичний ген, що комплементує дефект рецесивного ауксотрофного мутанта-господаря. Другий — позитивний, або домінуючий маркер. Це ген, котрий несе резистентність до певної токсичної речовини.

Найпоширенішою для дріжджів системою

трансформації є система із застосуванням комплементарного маркера. Її конструювання складається з двох окремих стадій. Перша — ідентифікація ауксотрофного мутанта зі специфічним ензиматичним дефектом. Для розв'язання цієї проблеми можна скористатися одним з методів селекції мутантів, напрацьованих для *Saccharomyces cerevisiae*. Друга стадія — одержання комплементарного біосинтетичного гена.

Для виділення специфічних типів ауксотрофних мутантів *S. cerevisiae* описано низку методів позитивної селекції та схем збагачення [1—3]. Іноді такі методи придатні для одержання бажаних мутантів-господарів у неконвенційних дріжджів. Перш за все це стосується дріжджів, споріднених з *S. cerevisiae*. Однак для дріжджів, неспоріднених з *S. cerevisiae*, багато з цих способів є непридатними. Наприклад, *Pichia pastoris* є нечутливими до уредосукцинату — речовини, що використовується для селекції піримідинових ауксотрофів *S. cerevisiae* [1]. Водночас цей вид дріжджів є дуже чутливим до α -аміноадипінової кислоти, котра застосовується для одержання *lys* мутантів *S. cerevisiae* [1]. Отже, для неконвенційних дріжджів може виникнути необхідність одержання та ідентифікації ауксотрофів за допомогою інших, ніж уже відомі, методів позитивної селекції.

У тому випадку, коли мутантний штаб з певним біосинтетичним дефектом ізольовано і охарактеризовано, наступним кроком у розробці трансформаційної системи комплементарного

пу є одержання гена, що комплементує цей дефект. Існує велика кількість повідомлень про те, що гетерологічні біосинтетичні гени комплементують відповідний дефект чужорідних дріжджових господарів. Така міжвидова комплементация має дві практичні переваги, що стосуються одержання того чи іншого біосинтетичного гена. Перша — це те, що відповідний наявний (а тому легкодоступний) ген *S. cerevisiae*, як правило, здатний комплементувати дефект у більшості чужорідних дріжджових господарів. Є багато прикладів міжвидової комплементации, у якій беруть участь гени *S. cerevisiae* і гетерологічні дріжджі-господарі [4—9]. Друга перевага полягає в тому, що, коли відповідний ген *S. cerevisiae* неклонований, то потрібний біосинтетичний ген можна виділяти з геному гетерологічного господаря шляхом комплементации наявної мутації *S. cerevisiae*. Наприклад, гени *ARG4* і *HIS4 P. pastoris* [1, 7], *URA3 Candida albicans* [10], *URA3* і *URA5 Dictyostelium discoideum* [11] були ізольовані з бібліотек ДНК внаслідок трансформації відповідних мутантів *S. cerevisiae*. Відомі також приклади успішного застосування ауксотрофів *Escherichia coli* для виділення дріжджових біосинтетичних генів [12, 13].

Дріжджовий штамп-господар з певним біосинтетичним дефектом і ген, що комплементує цей дефект, — це мінімум, необхідний для створення трансформаційної системи комплементацийного типу. Рекombінантна плазмiда, що містить лише дріжджовий біосинтетичний ген, але не має послідовності, що забезпечує реплікацію у клітинах дріжджів, здатна комплементувати дефект штамп-господаря тільки за рахунок інтеграції в геном. Така плазмiда, як і трансформаційна система, називається інтегративною [1]. Інтегративні плазмiди, як правило, забезпечують низьку частоту трансформації. Досягти підвищення частоти трансформації можна шляхом лінеаризації інтегративної плазмiди в межах нуклеотидної послідовності, гомологічної до геному штамп-господаря [1, 9].

Для суттєвого підвищення частоти трансформації (що є дуже важливим у випадку створення трансформаційної системи для клонування унікальних генів) необхідно сконструювати реплікативну плазмiду. Обов'язковим елементом такої плазмiди є наявність у її складі ARS послідовності (Autonomous Replicating Sequence). Окрім здатності забезпечувати автономну реплікацію, ARS послідовність має ще одну важливу характеристику — значно підвищувати частоту трансформації [9, 14, 15]. Вперше ARS послідовності було клоновано з геному *S. cerevisiae* як такі, що забезпечують автономну реплікацію плазмiдної ДНК в ядрах

клітин цього виду дріжджів [16]. Не всі ARS елементи, що підтримують реплікацію плазмiд в *S. cerevisiae*, функціонують як реплікатори у своїй нативній локалізації на хромосомі [16]. На сьогодні відомо багато ARS послідовностей *S. cerevisiae* та інших видів дріжджів ([17], а також див. нижче). ARS елементи є, як правило, видоспецифічними і не функціонують в гетерологічних умовах.

Система господар — доміантний маркер, як згадувалося вище, передбачає використання речовини, до якої дріжджі є чутливими, і гена, що забезпечує резистентність до цієї речовини. Для трансформації *S. cerevisiae* та споріднених з цим видом дріжджів описано успішне застосування низки доміантних маркерів. Це такі гени *E. coli*: ген аміноглікозидфосфотрансфери транспозонового елемента *Tn601 (Tn903)*, що несе резистентність до антибіотика G418 (інша назва — генетицин) [18]; ген фосфотрансфери гідроміцину В, котрий забезпечує резистентність до цього антибіотика [19]; ген хлорамфеніколацетилтрансфери, що несе резистентність до хлорамфеніколу [20]; ген дигідрофолатредуктази, котрий забезпечує резистентність до сульфоніаміду і метотрексату [21]. Крім того, успішно застосовано як доміантні маркери певні гени *S. cerevisiae*, а саме: гени UDP-N-ацетилглюкозамін-1-P-трансфери і 3-гідрокси-3-метилглютаніл-CoA-редуктази, котрі у складі мультікопійних плазмiд забезпечують резистентність до тунікаміцину і компактину відповідно [22]; ген ацетолактатсинтази (ILV2), що несе резистентність до сульфонілкарбамідних гербіцидів [23]. Є також повідомлення про застосування доміантних маркерів для трансформації неконвенційних дріжджів (див. нижче).

Система з доміантним маркером має певні переваги перед системою господар — комплементацийний маркер. По-перше, не є проблемою плідність реципієнтного штамп на відміну від комплементацийних систем, де використовуються рецесивні мутації. По-друге, розробка системи з доміантним маркером не потребує виділення і характеристики ауксотрофних мутантів і біосинтетичних генів. Однак неконвенційні дріжджі не завжди чутливі до тих речовин, до яких є чутливіми *S. cerevisiae*. Зокрема, 16 видів нетрадиційних дріжджів нечутливі до генетицину (G418), що унеможливорює використання цього антибіотика і відповідно гена резистентності при розробці систем генетичної трансформації [24]. Резистентність до тієї чи іншої токсичної речовини вимагає ефективної експресії відповідного гена та мультікопійності плазмiди, на якій знаходиться цей ген. Наявні вектори *S. cerevisiae* з доміантними маркерами, як

правило, не забезпечують вищезгаданих характеристик у системах таксономічно віддалених дріжджів. Тому безпосереднє використання таких векторів для трансформації неспоріднених видів не призводить до позитивного результату [1]. Ефективне застосування домінантних маркерів у системі якогось-небудь виду неконвенційних дріжджів вимагає наявності мультикопійної плазміді та ефективного промотора, одержання яких, зі свого боку, потребує попереднього конструювання системи господар — комплементарний маркер.

Трансформаційні системи для окремих видів неконвенційних дріжджів. Фундаментальне та прикладне значення цих систем. *Kluyveromyces lactis* є біотехнологічно важливим організмом, що може рости на лактозі [24]. Перша успішна система трансформації для цього виду базувалася на сконструйованих рекомбінантних плазмідах, що містили селективні маркери комплементарного типу — гени *LAC4 K. lactis* і *TRP1 S. cerevisiae* [4]. Виявилося, що *ARS1 S. cerevisiae* зовсім не функціонує у клітинах *K. lactis* — плазміді *pLA*, що містила вищезгаданий реплікатор, поводитися як інтегративна. Реплікатор 2 μ m плазміді в *K. lactis* експресувався неефективно — плазміді *PTY75-LAC4* трансформувала клітини цього виду дріжджів з низькою частотою і підтримувалася в кількості однієї—двох копій. Водночас плазміді з серії *pKARS*, що містили у своєму складі клоновані *ARS* елементи *K. lactis*, трансформували ці дріжджі з високою частотою — $(1-3) \cdot 10^7$ /мкг плазміді і підтримувалися автономно у кількості приблизно п'яти копій на клітину. Отже, *ARS* послідовності *S. cerevisiae* або не функціонують взагалі, або ж функціонують неефективно в клітинах *K. lactis*, що свідчить про відмінності механізмів реплікації між цими двома видами дріжджів.

Автори роботи [25] описали ефективну систему трансформації для *K. lactis* з використанням векторів — похідних 1,6 μ m кільцевої плазміді *pKD1*. Цю криптичну плазміді виділено як нативну з *K. drosophilae* [25]. Функціональна організація *pKD1* є дуже подібною до 2 μ m плазміді *S. cerevisiae*, хоча їхні нуклеотидні послідовності мають низький ступінь гомології. Виявилося, що *pKD1* (4,76 тис. п. н.) здатна ефективно експресуватися у *K. lactis* — стабільно передаватися при мітотичному поділі і підтримуватися в мультикопійному стані в кількості приблизно 70 копій на клітину. Використовуючи цілісну плазміді *pKD1* або її фрагменти з реплікатором і маркерний ген *URA3 S. cerevisiae*, було сконструйовано низку векторів, що трансформували *ura3* мутант *K. lactis* з високою ефективністю — $(0,3-5) \cdot 10^4$ /мкг плаз-

міді. Вектор *pCXJ-Kan1*, окрім цілісної плазміді *pKD1* і маркера *URA3*, ніс ще й ген резистентності до канаміцину з транспозонового елемента *Tn903*. Такий вектор ефективно трансформував клітини *K. lactis* і надавав їм резистентність до генетицину (G418). Отже, Біанчі з співавт. сконструювали високоефективні трансформаційні системи для *K. lactis*, застосувавши як комплементарний, так і домінантний маркери [25].

Успішне використання домінантного маркера — гена резистентності до G418 — описується й іншими авторами [24]. Ген резистентності до канаміцину з бактерійного транспозона *Tn903* може експресуватися у *K. lactis* зі свого власного промотора. Для селекції трансформантів *K. lactis*, резистентних до генетицину, використовується концентрація 200 мкг антибіотика на 1 мл середовища. Ген *Km^r*, введений до *K. lactis* у складі мультикопійного вектора, забезпечує резистентність до G418 на рівні понад 2 мг/мл. G418 не може використовуватися у середовищах з високим вмістом солей (таких, наприклад, як стандартне YNB), оскільки *K. lactis* (так само, як *S. cerevisiae*) стають нечутливими до генетицину. Для відбору генетицин-резистентних дріжджових трансформантів використовується повне середовище — YPD (1 %-й дріжджовий екстракт, 1 %-й пептон, 2 %-ва глюкоза) [24].

Інтерес до трансформаційних систем *K. lactis* зумовлений, зокрема, здатністю цього виду дріжджів секретувати високомолекулярні білки. Той факт, що кілерний токсин *K. lactis*, ген якого знаходиться на лінійній плазміді *pGKLI* [24], секретується в культуральне середовище, засвідчив, що *K. lactis* можуть секретувати дуже великі білки. Оскільки на сьогодні задля підвищення рівнів продукування гетерологічних білків промисловими виробниками робляться спроби використання дріжджів замість бактерій, *K. lactis* стали одним з об'єктів досліджень у вищезгаданому контексті. Встановлено, що у *K. lactis* секретія чужорідних білків може визначатися не тільки сигнальним пептидом кілерного токсину, а й низкою сигнальних пептидів з гетерологічних джерел, у тому числі фактора спарювання α (*MF α*) *S. cerevisiae* та пре-пропослідовності альбуміну сироватки людини. Слід також зауважити, що в культуральних супернатантах *K. lactis* не виявлено протеаз, які б могли заважати продукуванню секретованих білків [24].

Для високоефективного продукування гетерологічних білків використовується стратегія двох типів: перший базується на експресії генів, що кодують чужорідний білок, інтегрованих у хромосому (такі гени виявляють високу мітотичну

стабільність); другий полягає у застосуванні мультикопійних плазмідних векторів, що несуть чужорідний ген (таким чином забезпечується висока доза гена). Обидва підходи щодо *K. lactis* дали успішні результати. Використовуючи інтегративний вектор, до хромосомного геному цього виду дріжджів введено спадкову інформацію, що забезпечила експресію та секрецію прохимоцину [26]. При цьому для забезпечення секреції застосовано сигнальний пептид фактора спарювання *S. cerevisiae* MF α . В іншому прикладі для експресії та секреції сироваткового альбуміну людини у *K. lactis* використано мультикопійний вектор — похідний *pKD1* [27]. В останньому випадку секреція забезпечувалася нативним сигнальним пептидом сироваткового альбуміну людини. В обох вищезгаданих прикладах вихід білка становив до кількох грамів на літр [26, 27].

Pichia pastoris. Метилотрофні дріжджі *P. pastoris* здатні використовувати метанол як єдине джерело вуглецю та енергії завдяки індукції низки ферментів, що беруть участь у метаболізмі цього спирту. Найбільше зростання активності спостерігається у випадку алкогольоксидази AOX (інша назва — метанолоксидаза, MOX), кількості якої сягають понад 30 % загального клітинного білка в клітинах, що ростуть на метанолі. Завдяки цим особливостям *P. pastoris* (разом з іншими метилотрофними дріжджами) привертають до себе велику увагу спеціалістів у галузі біохімії, молекулярної біології та біотехнології [28].

Ефективну трансформаційну систему для *P. pastoris* було розроблено із застосуванням комплектаційних маркерів *HIS4* *P. pastoris* або *S. cerevisiae* і відповідного ауксотрофного мутанта-господаря *P. pastoris* з пошкодженою гістидинолдегідрогеназою [7].

Виявлено, що *ARS1* послідовність *S. cerevisiae* не забезпечувала автономного статусу плазмід у клітинах *P. pastoris*. Водночас фрагмент ДНК *S. cerevisiae* величиною 3,8 тис. п. н. з геном *HIS4*, який не має *ARS* активності в *S. cerevisiae*, здатний підтримувати автономну реплікацію плазмід у клітинах *P. pastoris* [7].

Для одержання висококопійних плазмід було клоновано фрагменти ДНК *P. pastoris* із *ARS* активністю. Ці послідовності (*PARS1* і *PARS2*) забезпечували автономний статус плазмід, високу частоту трансформації (10^5 /мкг; метод — сферопластування) і копійність — приблизно 13 копій на клітину. *PARS1* і *PARS2* мали деякі спільні риси з *ARS* елементами *S. cerevisiae*, але при цьому були видоспецифічними і не функціонували в клітинах сахароміцетів [7]. Ці факти разом із вищевикладе-

ними свідчать про відмінність механізмів реплікації у *S. cerevisiae* і *P. pastoris*.

Перші спроби застосування домінуючих маркерів для *P. pastoris* не мали успіху [1]. Трансформація цього виду дріжджів векторами, що містили один з генів аміноглікозидфосфотрансферази (або з *Tn5*, або з *Tn903*) і реплікатор 2 μ m плазмід *S. cerevisiae*, не дала трансформантів, резистентних до G418. Спроби трансформувати *P. pastoris* плазмідом, що містила ген фосфотрансферази гігromіцину В, теж не мали успіху. Застосована плазмід *pLG89* містила ген резистентності до гігromіцину В під транскрипційним контролем промотора і термінатора гена *CYC1* *S. cerevisiae* [1]. Ця плазмід також містила реплікатор 2 μ m плазмід. Причиною відсутності трансформантів, резистентних до генетицину чи гігromіцину В, на думку авторів [1], могла бути нездатність реплікатора 2 μ m плазмід ефективно функціонувати в системі *P. pastoris*, а також (у випадку з гігromіцином В) слабе вираження промотора гена *CYC1* *S. cerevisiae* в клітинах цього виду метилотрофних дріжджів. Подальші дослідження показали, що для *P. pastoris* система «ген фосфотрансферази — резистентність до G418» є придатною тільки тоді, коли згаданий ген знаходиться в складі мультикопійної плазмід або коли має місце множинна інтеграція вектора, що несе ген аміноглікозидфосфотрансферази, в геном цього виду дріжджів [28].

На сьогодні, окрім вищезгаданого гена гістидинолдегідрогенази (*HIS4*), є повідомлення про клонування та секвенування й інших генів *P. pastoris*, а саме: алкогольоксидази *AOX1* і *AOX2*, дигідроксиацетонсинтази *DAS1* та *DAS2*, гліцеральдегідфосфатдегідрогенази *GAP* [28, 29]. Нещодавно було клоновано ген формальдегідегідрогенази *FLD1*, промотор якого індукується на рівні промотора *AOX1* — одного з найпотужніших для дріжджів [30].

Від 1988 року кілька фармацевтичних та біотехнологічних компаній запатентували технологію експресії генів у *P. pastoris*. Ця технологія базується на використанні промотора *AOX1* та індукції його метанолом. Щонайменше три продукти виробляються у значних кількостях із застосуванням технології експресії генів у *P. pastoris* — поверхневий антиген гепатиту В, сироватковий альбумін людини та інсуліноподібний ростовий фактор-1 [28].

Hansenula polymorpha. Трансформацію цього виду метилотрофних дріжджів було здійснено із застосуванням стратегії, подібної до раніше розробленої для *S. cerevisiae* [31—33]. Авторами [31] було ізольовано мутанти з пошкодженою орестилин-

5'-фосфатдекарбоксілазою (названі *odc1*). Ця мутація може комплементуватися геном *URA3 S. cerevisiae*. В інших випадках використовувалися мутанти *H. polymorpha* з дефектною β -ізопропілмалатдегідрогеназою і рекомбінантні плазмиди, що містили ген *LEU2 S. cerevisiae* [32, 33]. Для введення ДНК до клітин було розроблено різні процедури: сферопластування; «літєвий» метод; електропорація [31, 34, 35]. Найвища частота трансформації ($2 \cdot 10^4$ — $1,7 \cdot 10^6$) спостерігалася при застосуванні методу електропорації [35]. ARS1 елемент *S. cerevisiae* в клітинах *H. polymorpha* функціонує неефективно [31]. Те саме стосується реплікатор-подібної послідовності маркера *LEU2 S. cerevisiae* [36]. Реплікатор 2 μ m ДНК *S. cerevisiae* не має реплікативної функції в *H. polymorpha*. Було клоновано два ARS елементи з хромосомної ДНК *H. polymorpha* (HARS1 і HARS2), що забезпечували високу копієність плазмід у клітинах цього виду дріжджів (30—40 на клітину) [31]. Тихомирова із співавт. ізолювали ARS елементи *H. polymorpha* з мітохондріальної ДНК [32]. Визначено нуклеотидну послідовність HARS1 [31]. З'ясовано, що це АТ-багатий фрагмент величиною 0,5 тис. п. н. HARS1 не містить ACS (ARS Consensus Sequence) — послідовності, що є обов'язковою для ARS елементів *S. cerevisiae*. HARS1 і HARS2 не функціонують у *S. cerevisiae*. Богданова із співавт., використовуючи інтегративні плазмиди, одержали ще кілька нових HARS елементів з геному *H. polymorpha* [37].

Як і у випадку з ARS-вмісними плазмідами *S. cerevisiae*, всі реплікативні вектори *H. polymorpha* в клітинах розподіляються дуже неоднорідно. Внаслідок цього трансформанти є дуже нестабільними в неселективних умовах [31, 32]. Однак під час росту в селективних умовах протягом певного часу (30—40 генерацій) плазмиди, якими здійснювалася трансформація, формують спонтанні тандемні багатокопійні полімери (приблизно 100 копій на клітину), що забезпечують високу мітотичну стабільність [31, 32]. Така особливість є дуже корисною для забезпечення значних рівнів експресії чужорідних білків. Ймовірно, ці плазмідні мультимери інтегрують до хромосом [38].

Для *H. polymorpha* характерним є високий відсоток негомологічної рекомбінації, тому досягти цільової інтеграції того чи іншого вектора в певне місце геному важко [38]. Однак, якщо взяти плазмиду з геном метанолоксидази (*HpMOX*), лінеаризованим у межах гомологічної області, то частота цільової інтеграції може становити від 1 до 22 % [38].

Промотор *HpMOX*, відомий як один з най-

сильніших промоторів у дріжджів, на сьогодні використовується для експресії гетерологічних генів у *H. polymorpha* [38, 39]. Для забезпечення оптимальної експресії гетерологічних білків необхідною є промоторна область довжиною 1,5 тис. п. н., що знаходиться у 5'-регіоні від АТГ відкритої рамки трансляції *HpMOX*. Окрім гена метанолоксидази, ще два інші гени *H. polymorpha* — дигідроксиацетонсинтази та форміатдегідрогенази — індукуються метанолом на порівняно високому рівні. Обидва ці гени клоновано [38], але поки що лишень промотор форміатдегідрогенази використано для експресії гетерологічних білків. Одержані результати свідчать, що при застосуванні промотора форміатдегідрогенази можна досягти навіть вищого рівня експресії гетерологічних білків, аніж при використанні промотора *HpMOX* [39].

Candida maltosa. Науковий та комерційний інтерес до дріжджів *C. maltosa* зумовлений, зокрема, їхньою здатністю рости на широкому спектрі субстратів включно з *n*-алканами і жирними кислотами. На сьогодні є пройденими всі необхідні етапи генно-інженерної роботи щодо конструювання системи вектор — господар для цього виду. З геному *C. maltosa* були виділені ARS та центромерна (CEN) послідовності і використані для конструювання реплікативних векторів [40—43]. Ізольовано низку ауксотрофних мутантів і відповідних генів, що комплементують ці мутації (*ADE1*, *ADE2*, *ARG4*, *LEU2*, *HIS5*, *URA3*, *CYS2*), та застосовано їх як маркери для трансформації *C. maltosa* [44].

Найкраще охарактеризованим є ARS елемент, ізольований з штама *C. maltosa* IAM12247. Його було клоновано у складі фрагмента TRA (*TR*ansformation Ability) величиною 3,8 тис. п. н. Власне елемент ARS в регіоні TRA знаходився на фрагменті величиною 0,2 тис. п. н. Він функціонував і в *C. maltosa*, і в *S. cerevisiae* [41]. Регіон TRA містить також і центромеру (CEN) *C. maltosa* [43]. При використанні регіону TRA величиною 3,8 тис. п. н. стабільність плазмиди в неселективних умовах є дуже високою (біля 80 % після 10 генерацій), а її копієність — низькою (одна—дві копії на геном). Такі характеристики притаманні реплікативним векторам *S. cerevisiae*, котрі містять у своєму складі центромеру.

При використанні ж тільки регіону ARS величиною 0,2 тис. п. н. стабільність плазмиди суттєво знижується (менше 10 % після 10 генерацій), а копієність — підвищується (понад 20 копій на геном), що є характерним для векторів *S. cerevisiae*, які містять лише ARS. Регіон CEN *C. maltosa* було субклоновано на фрагменті величиною 0,3 тис. п. н. Цей регіон є гомологічним до центромерної

області *S. cerevisiae* [43]. Загалом ARS елементи *C. maltosa* спричиняють значне підвищення частоти трансформації і утворення мітотично нестабільних трансформантів, що є типовим для автономних реплікативних плазмід [40—42].

Перші системи трансформації для *C. maltosa* розроблено із використанням генів *S. cerevisiae* *ARG4* [6], *LEU2* [40] та *LYS2* [45], котрі комплементували відповідні мутації *C. maltosa*. Низка маркерних генів *S. cerevisiae*, таких як *HIS5*, *URA3*, *TRP1*, не функціонують у *C. maltosa* [44].

На сьогодні немає таких домінуючих маркерних генів, які можна було б використати для трансформації *C. maltosa* [44]. Водночас з *C. maltosa* виділено кілька домінуючих маркерних генів, котрі придатні для трансформації штамів дикого типу *S. cerevisiae* і рослин. Зокрема, ізольовано ген *FDH1*, що забезпечує резистентність до формальдегіду у *S. cerevisiae* [46]. Клонований ген *CYH* забезпечує резистентність до циклогексимиду як у *S. cerevisiae*, так і у клітин рослини *Nicotiana tabacum* [47].

Для дріжджів *C. maltosa* застосовують три основні методи трансформації: 1) сферопластування; 2) літєвий метод; 3) електропорація. Найефективнішим з вищезгаданих є метод електропорації, при якому частота трансформації становить $7 \cdot 10^4$ трансформантів/мкг ДНК [44].

Наявність низки систем генетичної трансформації для *C. maltosa* дала можливість розгорнути широкий спектр експериментів, що стосуються експресії як гомологічних, так і гетерологічних генів у клітинах цього виду *n*-алканзасвоюючих дріжджів. Зокрема, використовуючи промоторну та термінаторну області регульованого гена *PGK1 C. maltosa* (кодує фосфогліцераткіназу; індукується глюкозою та репресується алканами чи жирними кислотами), продемонстровано функціональну експресію ендogenous гена *CYP52A3* (ген біосинтезу цитохрому P450) і гетерологічного гена *LAC4-K1*, що кодує β -галактозидазу *K. lactis* [48]. Перевірено можливість експресії в системі *C. maltosa* кількох гетерологічних генів — *lacZ* і *gysA E. coli* — кодують β -галактозидазу та β -глюкуронідазу відповідно; ген 2,3-дигідроксибіфенілдіоксигенази *Pseudomonas sp.*; ген катехол-2,3-діоксигенази *P. putida* і ген ссавців *P450C21* [49]. Всі перелічені гени не експресувалися у *C. maltosa*, хоча в деяких випадках було показано синтез відповідних транскриптів. Останнє свідчить про труднощі в експресії гетерологічних генів на посттранскрипційному рівні, що може бути пов'язане зі зміною в генетичному коді цього виду дріжджів. Відомо, що у *C. maltosa* є відхилення від універсального генетично-

го коду: триплет CTG кодує серин, а не лейцин [49].

Те, що змістова зміна кодону CTG може бути головною причиною тих труднощів, котрі зустрічаються при вираженні гетерологічного гена у *C. maltosa*, було продемонстровано для *URA3 S. cerevisiae*. Один CTG кодон гена *Sc-URA3*, який не міг комплементувати *ura3* мутацію *C. maltosa*, було замінено на лейциновий триплет CTC. Після такої заміни модифікований ген *Sc-URA3* функціонально виражався у *C. maltosa* [49]. Такий результат є першим успішним прикладом функціонального вираження гетерологічного гена у *Candida*, що має змістову зміну триплету за допомогою заміни в гені кодону CTG на інший. Водночас відомо, що гени *LEU2 S. cerevisiae* і *LAC4 K. lactis* функціонально експресуються у *C. maltosa*, хоча мають один або два CTG кодони відповідно. Таке явище є результатом того, що позиція CTG кодону в цих генах не впливає на функцію закодованих білків [44].

Отже, застосування розроблених систем вектор — господар для *C. maltosa* на сьогодні лімітується щодо гетерологічної експресії різних генів, якщо наявні в цих генах кодони CTG спричиняють серйозні наслідки для функціонування відповідних продуктів. З іншого боку, системи генетичної трансформації *C. maltosa* можуть бути дуже корисними для експресії генів, ізольованих із споріднених дріжджів *Candida*, таких як *C. albicans*, *C. cylindracea*, *C. melibiosa*, *C. rugosa*, *C. zeylanoides* та *C. parapsilosis*, у яких так само, як і в *C. maltosa*, спостерігається змістова заміна кодону CTG [44].

Schwanniomyces occidentalis. Особливістю цього виду дріжджів, що зумовлює інтерес до них, є, зокрема, здатність ефективно розщеплювати крохмаль за допомогою спільної дії α -амілази та глюкоамілази [50]. Перша система трансформації *Schw. occidentalis* базувалася на гомологічному маркері *ADE2* [51, 52]. Мутант *Schw. occidentalis ade2* використовували як реципієнтний штам. У клітинах трансформантів ген *ADE2* або інтегрував у геном, або ж підтримувався як екстрахромосомний елемент. Останній факт свідчить про те, що фрагмент ДНК *Schw. occidentalis*, котрий несе ген *ADE2*, містить також і послідовність автономної реплікації. *ADE2*-вмісні плазміди в клітинах трансформантів утворювали високомолекулярні рекомбіанти. Трансформанти з такими рекомбіантними плазмідами були мітотично стабільними [52].

Іншу серію векторів для *Schw. occidentalis* було розроблено з застосуванням гена *TRP5 S. cerevisiae* як селективного маркера і *SwARS* елементів — *SwARS1* і *SwARS2* [53, 54]. *SwARS1* ідентифіковано на фрагменті ДНК величиною 1,5 тис. п. н.,

що містить ген *HIS4 Schw. occidentalis* [53]. *SwARS2* ідентифіковано в 3'-фланкуючій області гена глюкоамілази (*GAM1*), котрий на сьогодні є клонований і секвенований [54]. Плазмід, що містять *SwARS* і сахароміцетний ген *TRP5* як селективний маркер, реплікуються автономно і в *S. cerevisiae*, і в *Schw. occidentalis* [53, 54]. *SwARS* плазмід є мітотично нестабільними, їхня копійність становить 5—10 копій на клітину [53, 54]. На відміну від *SwARS*-векторів (котрі реплікуються однаково ефективно і в *S. cerevisiae*, і в *Schw. occidentalis*), плазмід, що несуть *ARS S. cerevisiae*, є вкрай нестабільними та низькокопійними (в середньому 1 копія на клітину) в *Schw. occidentalis* [53]. На сьогодні ще немає плазмід з центромерною областю (*CEN Schw. occidentalis*) [50].

Векторні системи, про які йшлося вище, забезпечують основу для використання *Schw. occidentalis* як господаря для експресії гетерологічних генів. Клоновані на сьогодні різноманітні гени *Schw. occidentalis* — всього їх 14 [50] — є джерелом промоторів, термінаторів та сигнальних послідовностей, що обумовлюють секрецію білків у *Schw. occidentalis*. Особливо цікавими є промотори таких регульованих генів, як *INV1* (ген інвертази) [55], *AMY1* (ген α -амілази) [56], *SWA2* (ген ще однієї α -амілази) [57] і *GAM1* [54]. За допомогою генів *Schw. occidentalis*, що кодують α -амілазу і глюкоамілазу та векторних систем *S. cerevisiae*, було сконструйовано штами *S. cerevisiae*, в яких вищезазначені гени експресують. Такі штами здатні повністю розщеплювати крохмаль. Досліджується можливість застосування цих штамів *S. cerevisiae* в промислових процесах [50].

Yamadazyma (Pichia) ohmeri. Цей вид гетеролітичних аспорогенних дріжджів має біотехнологічне значення; штами *Y. ohmeri* застосовуються для виробництва лимонної кислоти, D-арабітолу, а також гамма-лактонів, котрі використовуються як ароматизатори в харчовій промисловості [58].

У розробленій системі генетичної трансформації для цього виду дріжджів були використані біосинтетичні гени, що кодують відомі біохімічні функції — *YoLEU2* (ген β -ізопропілмалатдегідрогенази) і *YoURA3* (ген оротидин-5'-монофосфатдекарбоксілази) [58].

Плазмід *poLEU02*, *poLEU04* і *poLEU08* — похідні бактерійної *pBSSK* — трансформували мутант *Yoleu2* з високою частотою (приблизно 10^3 /мкг ДНК; метод — електропорація) і автономно реплікувалися у клітинах трансформантів. Отже, вищезгадані плазмід містили в своєму складі послідовності, котрі функціонували в клітинах *Y. ohmeri* як *ARS*. Показано, що ці послідовності

знаходяться поза фрагментом ДНК *Y. ohmeri*, що несе ген *YoLEU2*. Однак всі ці плазмід були дуже нестабільними: рівень їхньої втрати становив понад 30 % на генерацію. Тому з банку генів *Y. ohmeri* було клоновано шість послідовностей (величиною від 1 до 4 тис. п. н.), кожна з яких забезпечувала високу частоту трансформації для даного виду дріжджів (від 200 до 1000 трансформантів на 1 мкг) і автономну реплікацію. Копійність реплікативних плазмід, що містили послідовності *YoARS*, становила в середньому 40 копій на клітину [58].

Лінеаризація реплікативних плазмід (*poLEU08* і *poARS*) перед трансформацією підвищувала ефективність щонайменше у 2—5 разів. Місце «розрізу» (у векторній послідовності чи у дріжджовій вставці, що фланкує селективний маркер) не мало значення. Трансформанти, одержані за допомогою лінеаризованих реплікативних плазмід, були мітотично нестабільними і містили незмінні або з дуже незначними змінами плазмід. У жодному випадку не спостерігалось інтеграції.

Трансформація (методом електропорації) плазмідною *poLEU09*, котра не містить реплікатора для *Y. ohmeri*, давала позитивний результат лише у випадку лінеаризації цієї плазмід в межах області, гомологічної до дріжджового геному (10—50 *Leu* колоній на 1 мкг ДНК). Трансформанти, одержані за допомогою лінеаризованої *poLEU09*, утворювалися в результаті гомологічної інтеграції однієї копії вектора в геном [58].

Отже, для дріжджів *Y. ohmeri* розроблено систему трансформації, в якій використані реципієнтні штами-господарі *leu2*, або *leu2 ura3* і вектори (інтегративні та реплікативні) з маркерами *YoLEU2* і *YoURA3*.

Yarrowia lipolytica. Цей вид як джерело вуглецю ефективніше використовує різні поліалкоголі, органічні кислоти чи *n*-парафіни, аніж цукри. Дріжджам *Y. lipolytica* притаманна висока екстрацелюлярна протеазна та ліпазна активності. Штами цього виду використовуються для промислового виробництва лимонної кислоти та білково-вітамінного концентрату на парафінах нафти [59].

Для *Y. lipolytica* розроблені трансформаційні системи як інтегративного, так і реплікативного типу. Як маркери використовуються біосинтетичні гени *YILEU2* (ген β -ізопропілмалатдегідрогенази) та *YIURA3* (ген оротидин-5'-монофосфатдекарбоксілази).

Інтегративна трансформація відбувається майже виключно шляхом гомологічної рекомбінації і стимулюється лінеаризацією вектора в межах гомологічного регіону (частота зростає в 100—1000 разів порівняно з кільцевим вектором). Це призво-

дять до дуже високої частоти трансформації (10^6 трансформантів на 1 мкг ДНК) [60].

Реплікативні вектори для *Y. lipolytica* несуть одночасно і реплікатор (*ORI*), і центромерну область. Виявляється, що у *Y. lipolytica* послідовність *ORI* сама по собі не здатна підтримувати плазмиду екстрахромосомно. Для забезпечення автономної реплікації плазмиду обов'язково повинна містити, окрім *ORI*, ще й центромерну послідовність [61]. На сьогодні ізолювано три різні *ARS* послідовності; кожна містить центромеру (*CEN*) та розміщену поряд хромосому послідовність *ORI* [59]. Послідовності *ORI* та *CEN* *Y. lipolytica* не виявляють гомології до відповідних послідовностей *S. cerevisiae*, *K. lactis* чи *S. pombe* [59].

Через те, що реплікативні вектори *Y. lipolytica* несуть і *ORI*, і *CEN* послідовності, вони є, як правило, відносно стабільними в неселективних умовах і низькокопійними (1—3 копії на клітину) [59]. Трансформація реплікативними векторами дріжджів *Y. lipolytica* (літєвим методом або електропорацією) забезпечує частоту на рівні 10^3 — 10^4 трансформантів на 1 мкг ДНК. Це значно менше, ніж у випадку інтегративної гомологічної трансформації (до 10^6 /мкг ДНК; див. вище). Останній факт є видовою особливістю дріжджів *Y. lipolytica*, оскільки, як правило, реплікативні плазмиди забезпечують значно вищу частоту трансформації порівняно з інтегративними.

У системі *Y. lipolytica* показано експресію низки гетерологічних маркерів. Зокрема, продемонстровано вираження гена резистентності до флеміцину (ген бактерійного транспозону *Tn5*) під контролем *YILEU2* промотора [62]. Ген *Streptomyces hygroscopus*, що забезпечує резистентність до гігроміцину, було приєднано до промотора *XPR2* (ген лужної позаклітинної протеази AEP — Alkaline Extracellular Protease) *Y. lipolytica*. В результаті трансформації інтегративною або реплікативною плазмидою резистентні до гігроміцину колонії з'являлися з частотою (50—100)/мкг ДНК [59]. Як селективний маркер було використано також ген, що кодує інвертазу *S. cerevisiae* — *SUC2* [63]. Всі перевірені на сьогодні дикі штами *Y. lipolytica* мають фенотип *Suc*⁻, тобто не спроможні рости на сахарозі [59]. Ген *SUC2* було поставлено під контроль промотора *XPR2*. Введення такої рекомбінантної конструкції у складі інтегративної плазмиди до клітин *Y. lipolytica* призводить до здатності трансформантів рости на сахарозі [63].

Для дріжджів *Y. lipolytica* розроблено вектори експресії та вектори секреції з використанням елементів гена *XPR2* [59]. У випадку векторів експресії з гена *XPR2* делетовано кодуючу послідов-

ність; між промотором цього гена та 3'-областю, що несе сигнали термінації транскрипції, введено сайт рестриктази *Bam*HI. Це дає змогу вводити гетерологічні гени (фланковані сайтами *Bam*HI) під промотор та термінатор *XPR2*. Таким чином, у клітинах *Y. lipolytica* було успішно експресовано гени *E. coli xylE* (ген β -глюкуронідази) та *lacZ* (ген β -галактозидази), а також ген *S. hygroscopus hph* (гіпромідинфосфотрансферази). При розробці векторів секреції використано сигнальну послідовність гена *XPR2*. Для забезпечення секреції чужорідних білків було сконструйовано вектори, що несуть зручні сайти рестрикції відразу по закінченні сигнальної послідовності гена *XPR2*. Частина кодуючої послідовності *XPR2* було делетовано і залишено лише її невеликий фрагмент, що кодує С-кінцеві амінокислоти. Мінімальну термінаторну послідовність було синтезовано за допомогою полімеразної ланцюгової реакції з 3'-фланкуючої області гена *XPR2*. Такі секреторні вектори були успішно використані для досягнення секреції α -інтерферону свині, прохизозину великої рогатої худоби та плазміногенного активатора тканинної культури людини [64].

Pichia guilliermondii. Флавіногенні дріжджі *P. guilliermondii* можуть утилізувати вуглеводні як єдине джерело вуглецю та енергії [65]. Здатність цього виду синтезувати великі кількості рибофлавіну в умовах дефіциту заліза [65] дає підстави розглядати його як потенційний промисловий над-продукт вітаміну B_2 .

Система трансформації для *P. guilliermondii* базується на використанні генів *RIB1* (кодує GTP-циклогідролазу) та *RIB7* (кодує рибофлавінсинтазу) як маркерів і відповідно мутантів *rib1* та *rib7* як штамів-господарів [66]. Гени *RIB1* та *RIB7* *P. guilliermondii* було клоновано з бібліотеки цього виду дріжджів шляхом трансформації мутантів *E. coli ribA* (з блокованою GTP-циклогідролазою) та *ribB* (з пошкодженою рибофлавінсинтазою) [12, 13]. Здійснено рестрикційний аналіз фрагментів, котрі містять ген *RIB1* та *RIB7* [12, 13]; визначено нуклеотидну послідовність гена *RIB1* [67]. Сконструйовано низку рекомбінантних плазмід, що містять ген GTP-циклогідролази або рибофлавінсинтази *P. guilliermondii* [12, 13, 66]. Двома методами — літєвим та сферопластуванням — успішно трансформовано мутанти *rib1* та *rib7* цих флавіногенних дріжджів одержаними рекомбінантними плазмидами [66]. Виявилось, що плазмиди, котрі містять фрагмент ДНК з геном *RIB1*, трансформують дріжджі *P. guilliermondii* в 100—1000 разів ефективніше, ніж плазмиди з геном *RIB7* [66]. Як відомо, висока частота трансформації тією чи

іншою плазмідом може бути результатом наявності в її складі ARS послідовності [9, 14, 15]. За допомогою функціонального аналізу та аналізу нуклеотидної послідовності геномного фрагмента, що містить ген *RIB1*, було локалізовано ARS елемент *P. guilliermondii* — *PgARS* [66]. Він має довжину приблизно 130 п. н. і частково перекривається з 3'-кінцем гена GTP-циклогідролази. *PgARS* характеризується підвищеним вмістом A+T пар і має в своєму складі дві послідовності з високою гомологією (9 з 11 нуклеотидів збігаються) до ACS (ARS Consensus Sequence) *S. cerevisiae* [66]. Наявність *PgARS* у складі рекомбінантної конструкції забезпечує високу частоту трансформації реципієнтних штамів *P. guilliermondii* (10^4 — 10^5 /мкг; метод сферопластування) та автономний статус плазмиди в клітинах [66]. Копійність плазмід, що несуть *PgARS*, становить 10—12 на клітину. Дріжджові трансформанти, котрі містять плазмиди з *PgARS* послідовністю, є мітотично нестійкими; плазмідна ДНК з таких трансформантів легко виділяється через ретрансформацію *E. coli* [66].

На основі бактерійного вектора *pUC19* та геномних фрагментів *P. guilliermondii*, що містять ген *RIB1* або *RIB7* і *PgARS*, було сконструйовано низку човникових для *E. coli* та *P. guilliermondii* плазмід. Розроблена система генетичної трансформації для *P. guilliermondii* із застосуванням вищезазначених човникових плазмід і мутантів *rib1* та *rib7* як штамів-господарів [66] є основою для подальшого вивчення регуляторних механізмів флавіногенезу на молекулярному рівні та одержання за допомогою генно-інженерних методів нових штамів — надсинтетиків вітаміну B₂.

Таким чином, за минулі два десятиліття досягнуто значних успіхів у розвитку трансформаційних систем вектор — господар для клонування та експресії генетичного матеріалу у неконвенційних дріжджів. Для багатьох видів розроблено системи генетичної трансформації із застосуванням як комплементарних, так і домінантних маркерів. Клоновано велику кількість різноманітних генів, визначено їхні нуклеотидні послідовності, досліджено і порівняно структурні, промоторні та термінаторні області. Створено велику кількість рекомбінантних конструкцій, у тому числі з використанням сильних дріжджових промоторів [28, 30, 38, 39], що забезпечують ефективну експресію гетерологічних білків. Одержані на основі цього знання мають велике фундаментальне значення. Деякі з розроблених систем експресії вже застосовуються для промислового виробництва певних речовин [26—28, 38, 64]. Сьогодні процес молекулярно-біологіч-

ного вивчення різних видів неконвенційних дріжджів перебуває на стадії активного розвитку, поглиблюються знання про ці мікроорганізми, щораз зростає кількість вискоєфективних систем експресії, котрі можуть застосовуватися або вже впроваджуються у виробництво.

Водночас слід зазначити, що трансформаційні системи вектор — господар для неконвенційних дріжджів потребують подальшого вдосконалення для підвищення ефективності трансформації та стабільного успадкування трансформованих маркерів.

Проблема молекулярно-генетичного дослідження неконвенційних дріжджів знаходиться лише на початку інтенсивного розвитку. Для багатьох видів, дослідження яких мають фундаментальне та прикладне значення, систем трансформації не створено взагалі. Це стосується, зокрема, багатьох видів роду *Candida*, серед яких відомі продуценти ферментів та біологічно активних сполук, а також збудники захворювань людини, сільськогосподарських тварин і рослин.

А. Я. Вороновский, А. А. Сибирный

Развитие трансформационных систем вектор — хозяин для клонирования и экспрессии генетического материала у неконвенционных дрожжей

Резюме

Рассмотрены особенности конструирования систем генетической трансформации дрожжей. Описано развитие таких систем для отдельных видов неконвенционных дрожжей. Показано фундаментальное и прикладное значение разработанных дрожжевых систем вектор — хозяин.

A. Voronovsky, A. A. Sybirny

Development of cloning and expression transformation systems for nonconventional yeasts

Summary

Some features of the construction of yeast transformation systems are considered. Development of such systems for some nonconventional yeast species is reviewed. The fundamental and applied significance of developed yeast host-vector systems is shown.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Cregg J. M., Madden K. R. Development of yeast transformation systems and construction of methanol-utilization-defective mutants of *Pichia pastoris* by gene disruption // Biological research on industrial yeasts / Eds G. G. Stewart, I. Russel, R. D. Klein, R. R. Hiebsch.—Boca Raton: CRC press, 1987.—P. 1—18.
2. Chattoo B. B., Sherman F., Azubalis D. A., Fjellstedt T. A., Mehvert D., Ogur M. Selection of *lys2* mutants of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by the utilization of α -amino-adipate // Genetics.—1979.—93.—P. 51—54.
3. Boeke J. D., LaCroute F., Fink G. R. A positive selection for mutants lacking orotidine 5'-phosphate decarboxylase activity

- in yeast // *Mol. and Gen. Genet.*—1984.—197.—P. 345—346.
4. Das S., Hollenberg C. P. A high-frequency transformation system for the yeast *Kluyveromyces lactis* // *Curr. Genet.*—1982.—6.—P. 123—128.
 5. Das S., Kellerman E., Hollenberg C. P. Transformation of *Kluyveromyces fragilis* // *J. Bacteriol.*—1984.—158.—P. 1165—1167.
 6. Kunze G., Petzoldt C., Bode R., Samsonova I., Hecker M., Birnbaum D. Transformation of *Candida maltosa* and *Pichia guilliermondii* by plasmid containing *Saccharomyces cerevisiae* ARG4 DNA // *Curr. Genet.*—1985.—9.—P. 205—209.
 7. Cregg J. M., Barringer K. J., Hessler A. Y., Madden K. R. *Pichia pastoris* as a host system for transformations // *Mol. Cell. Biol.*—1985.—5.—P. 3376—3385.
 8. Beach D., Nurse P. High-frequency transformation of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* // *Nature.*—1981.—290.—P. 140—142.
 9. *Nonconventional Yeasts in Biotechnology* / Ed. K. Wolf.—Berlin: Springer, 1996.—617 p.
 10. Gillum A. M., Tsay E. Y., Kirsch D. R. Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae* *ura30* and *E. coli* *pyrF* mutations // *Mol. and Gen. Genet.*—1984.—198.—P. 179—182.
 11. Boy-Marcotte E., Vilaine F., Camonis J., Jacquet M. A DNA sequence from *Dictyostelium discoideum* complements *ura3* and *ura5* mutations of *Saccharomyces cerevisiae* // *Mol. and Gen. Genet.*—1984.—193.—P. 406—410.
 12. Закальський А. Е., Злочевський М. Л., Стасюв Ю. З., Логвиненко Е. М., Бебуров М. Ю., Шавловський Г. М. Клонирование гена *RIB1*, кодирующего фермент первого этапа флавиногенеза у дрожжей *Pichia guilliermondii* — ГТФ-циклолидроллазу, в клетках *Escherichia coli* // *Генетика.*—1990.—6, № 4.—С. 614—620.
 13. Логвиненко Е. М., Стасюв Ю. З., Злочевський М. Л., Вороновський А. Я., Бебуров М. Ю., Шавловський Г. М. Клонирование гена *RIB7*, кодирующего рибофлавинсинтазу дрожжей *Pichia guilliermondii* // *Генетика.*—1993.—29, № 6.—С. 922—927.
 14. Beggs G. D. Transformation of yeast by replicating hybrid plasmid // *Nature.*—1978.—275.—P. 104—109.
 15. Struhl K., Stinchcomb D. T., Scherer S., Davis R. W. High-frequency transformation of yeasts: autonomous replication of hybrid DNA molecules // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1979.—76.—P. 1035—1039.
 16. Stillman B. Replicator renaissance // *Nature.*—1993.—366.—P. 506—507.
 17. Rowley A., Dowell S. J., Diffley J. F. X. Recent developments in the initiation of chromosomal DNA replication: a complex picture emerges // *Biochim. et biophys. acta.*—1994.—1217.—P. 239—256.
 18. Webster T. D., Dickson R. C. Direct selection of *Saccharomyces cerevisiae* resistant to the antibiotic G418 following transformation with a DNA vector carrying the kanamycin-resistance gene of *Tn903* // *Gene.*—1983.—26.—P. 243.
 19. Gritz L., Davies J. Plasmid-encoded hygromycin B resistance: the sequence of hygromycin B phosphotransferase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* // *Gene.*—1983.—25.—P. 179—188.
 20. Cohen J. D., Abrams E., Eccleshall T. R., Buchfelder B., Marmur J. Expression of a prokaryotic gene in yeast: isolation and characterization of mutants with increased expression // *Mol. and Gen. Genet.*—1983.—191.—P. 451—459.
 21. Miyajima A., Miyajima I., Arai K., Arai N. Expression of plasmid R388-encoded type II dihydrofolate reductase as a dominant selective marker in *Saccharomyces cerevisiae* // *Mol. Cell. Biol.*—1984.—4.—P. 407—414.
 22. Rine J., Hansen W., Hardeman E., Davis R. W. Targeted selection of recombinant clones through gene dosage effects // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1983.—80.—P. 6750—6754.
 23. Falco S. C., Dumas K. S. Genetic analysis of mutants of *Saccharomyces cerevisiae* resistant to the herbicide sulfometuron methyl // *Genetics.*—1985.—109.—P. 21—23.
 24. Wesolowski-Louvel M., Breunig K. D., Fukuhara H. *Kluyveromyces lactis* // *Nonconventional yeast in biotechnology* / Ed. K. Wolf.—Berlin: Springer, 1996.—P. 139—201.
 25. Bianchi M. M., Falcone C., Jie C. X., Wesolowski-Louvel M., Frontali L., Fukuhara H. Transformation of the yeast *Kluyveromyces lactis* by new vectors derived from the 1.6 μ m circular plasmid *pKDJ1* // *Curr. Genet.*—1987.—12.—P. 185—192.
 26. Van den Berg J. A., Van der Laken K. J., Van Ooyen A. J. J., Renniens C. H. M., Rietveld K., Schaap A., Broke A. J., Bishop P. J., Schultz K., Moyer D., Richman M., Shuster J. R. *Kluyveromyces* as a host for heterologous gene expression: expression and secretion of prochymosin // *Bio/Technology.*—1990.—8.—P. 135—139.
 27. Yeh P., Landais D., Lemaitre M., Maury I., Crenne J. Y., Becquart J., Murry-Brelier A., Boucher F., Montay G., Fleer R. Design of yeast-secreted albumin derivatives for human therapy — biological and antiviral properties of a serum albumin-CD4 genetic conjugate // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1992.—89.—P. 1904—1908.
 28. Sreekrishna K., Kropp K. E. *Pichia pastoris* // *Nonconventional yeasts in biotechnology* / Ed. K. Wolf.—Berlin: Springer, 1996.—P. 203—253.
 29. Ellis S. B., Brust P. F., Koutz P. J., Waters A. F., Harpold M. M., Gingers T. R. Isolation of alcohol oxidase and two other methanol-regulatable genes from the yeast *Pichia pastoris* // *Mol. Cell. Biol.*—1985.—5.—P. 1111—1121.
 30. Shen S., Sulter G., Jeffries T. W., Cregg J. M. A strong nitrogen source-regulated promoter for controlled expression of foreign genes in the yeast *Pichia pastoris* // *Gene.*—1998.—216.—P. 93—102.
 31. Roggenkamp R., Hansen H., Eckart M., Janowicz Z., Hollenberg C. P. Transformation of the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* by autonomous replication and integration vectors // *Mol. and Gen. Genet.*—1986.—202.—P. 302—308.
 32. Tikhomirova L. P., Ikononova R. N., Kuznetsova E. N. Evidence for autonomous replication and stabilization of recombinant plasmids in the transformants of yeast *Hansenula polymorpha* // *Curr. Genet.*—1986.—10.—P. 741—747.
 33. Gleeson M. A., Ortori G. S., Sudbery P. E. Transformation of the methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* // *J. Gen. Microbiol.*—1986.—132.—P. 3459—3465.
 34. Tikhomirova L. P., Ikononova R. N., Kuznetsova E. N., Fodor I. I., Bystrykh L. V., Aminova L. R., Trotsenko Y. A. Transformation of methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*: Cloning and expression of genes // *J. Basic Microbiol.*—1988.—28.—P. 353—361.
 35. Faber K. N., Haima P., Harder W., Veenhuis M., G. A. B. Highly-efficient electrotransformation of the yeast *Hansenula polymorpha* // *Curr. Genet.*—1994.—25.—P. 305—310.
 36. Berardi E., Thomas D. Y. An efficient transformation method for *Hansenula polymorpha* // *Curr. Genet.*—1990.—18.—P. 169—170.
 37. Bogdanova A. I., Agaphonov M., Ter-Avanesyan M. D. Plasmid reorganization during integrative transformation in *Hansenula polymorpha* // *Yeast.*—1995.—11.—P. 343—353.
 38. Hansen H., Hollenberg C. P. *Hansenula polymorpha* (*Pichia angusta*) // *Nonconventional yeasts in biotechnology* / Ed. K. Wolf.—Berlin: Springer, 1996.—P. 293—311.

39. Gellissen G., Weydemann U., Strasser A. W. M., Piontek M., Janowicz Z. A., Hollenberg C. P. Progress in developing methylotrophic yeasts as expression systems // Trends Biotechnol.—1992.—10.—P. 413—417.
40. Takagi M., Kawai S., Chang M. C., Shibuya I., Yano K. Construction of a host—vector system in *Candida maltosa* by using an ARS site isolated from its genome // J. Bacteriol.—1986.—167.—P. 551—555.
41. Kawai S., Hwang C. W., Sugimoto M., Takagi M., Yano K. Subcloning and nucleotide sequencing of an ARS site of *Candida maltosa* which also functions in *Saccharomyces cerevisiae* // Agric. Biol. Chem.—1987.—51.—P. 1587—1591.
42. Sasnauskas K., Jomantiene R., Lebediene E., Lebedys J., Januska A., Janulaitis A. Molecular cloning and analysis of autonomous replicating sequence of *Candida maltosa* // Yeast.—1992.—8.—P. 253—259.
43. Ohkuma M., Kobayashi K., Kawai S., Hwang C. W., Ohta A., Takagi M. Identification of a centromeric activity in the autonomously replicating TRA region allows improvement of the host—vector system of *Candida maltosa* // Mol. and Gen. Genet.—1995.—249.—P. 447—455.
44. Mauersberger S., Ohkuma M., Schunck W.-H., Takagi M. *Candida maltosa* // Nonconventional yeasts in biotechnology / Ed. K. Wolf.—Berlin: Springer, 1996.—P. 411—580.
45. Kunze G., Bode R., Schmidt H., Samsonova I., Birnbaum D. Identification of a *lys2* mutant of *Candida maltosa* by means of transformation // Curr. Genet.—1987.—11.—P. 385—391.
46. Sasnauskas K., Jomantiene R., Januska A., Lebediene E., Lebedys J., Janulaitis A. Cloning and analysis of a *Candida maltosa* gene which confers resistance to formaldehyde in *Saccharomyces cerevisiae* // Gene.—1992.—122.—P. 207—211.
47. Sasnauskas K., Jomantiene R., Lebediene E., Lebedys J., Januska A., Janulaitis A. Cloning and sequence analysis of a *Candida maltosa* gene which confers resistance to cycloheximide // Gene.—1992.—116.—P. 105—108.
48. Masuda Y., Park S.-M., Ohkuma M., Ohta A., Takagi M. Expression of an endogenous and a heterologous gene in *Candida maltosa* by using a promoter of a newly isolated phosphoglycerate kinase (*PGK*) gene // Curr. Genet.—1994.—25.—P. 412—417.
49. Sugiyama H., Ohkuma M., Masuda Y., Park S.-M., Ohta A., Takagi M. *In vivo* evidence for non-universal usage of the codon CUG in *Candida maltosa* // Yeast.—1995.—11.—P. 43—52.
50. Dohmen R. J., Hollenberg C. P. *Schwanniomyces occidentalis* // Nonconventional yeasts in biotechnology / Ed. K. Wolf.—Berlin: Springer, 1996.—P. 117—137.
51. Klein R. D., Favreau M. A. Transformation of *Schwanniomyces occidentalis* with an *ADE2* gene cloned from *S. occidentalis* // J. Bacteriol.—1988.—170.—P. 5572—5578.
52. Klein R. D., Favreau M. A. A DNA fragment containing the *ADE2* gene from *Schwanniomyces occidentalis* can be maintained as an extrachromosomal element // Gene.—1991.—97.—P. 183—189.
53. Dohmen R. J., Strasser A. W. M., Zitomer R. S., Hollenberg C. P. Regulated overproduction of α -amylase by transformation of the amylolytic yeast *Schwanniomyces occidentalis* // Curr. Genet.—1989.—15.—P. 319—325.
54. Dohmen R. J., Strasser A. W. M., Dahlems U. M., Hollenberg C. P. Cloning of the *Schwanniomyces occidentalis* glucoamylase gene (*GAM1*) and its expression in *Saccharomyces cerevisiae* // Gene.—1990.—95.—P. 111—121.
55. Klein R. D., Poorman R. A., Favreau M. A., Shea M. H., Hatzenbuehler N. T., Nulf S. C. Cloning and sequence analysis of the gene encoding invertase from the yeast *Schwanniomyces occidentalis* // Curr. Genet.—1989.—16.—P. 145—152.
56. Strasser A. W. M., Selk R., Dohmen R. J., Niemann T., Bielefeld M., Seeboth P., Tu G., Hollenberg C. P. Analysis of the α -amylase gene of *Schwanniomyces occidentalis* and secretion of its gene product in transformants of different yeast genera // Eur. J. Biochem.—1989.—184.—P. 699—706.
57. Claros M. G., Abarca D., Fernandez-Lobato M., Jimenez A. Molecular structure of the *SWA2* gene encoding an *AMY1*-related α -amylase from *Schwanniomyces occidentalis* // Curr. Genet.—1993.—24.—P. 75—83.
58. Piredda S., Gaillardin C. Development of a transformation system for the yeast *Yamadazyma (Pichia) ohmeri* // Yeast.—1994.—10.—P. 1601—1612.
59. Barth G., Gaillardin C. *Yarrowia lipolytica* // Nonconventional yeast in biotechnology / Ed. K. Wolf.—Berlin: Springer, 1996.—P. 313—388.
60. Xuan J.-W., Fournier P., Gaillardin C. Cloning of the *LYS5* gene encoding saccharopine dehydrogenase from the yeast *Yarrowia lipolytica* by target integration // Curr. Genet.—1988.—14.—P. 15—21.
61. Fournier P., Abbas A., Chasles M., Kudla B., Ogrzyziak D. M., Yaver D., Xuan J.-W., Peito A., Ribet A.-M., Feynerol C., He F., Gaillardin C. Colocalization of centromeric and replicative functions on autonomously replicating sequences isolated from the yeast *Yarrowia lipolytica* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1993.—90.—P. 4912—4916.
62. Gaillardin C., Ribet A. M. *LEU2* directed expression of β -galactosidase activity and phleomycin resistance in *Yarrowia lipolytica* // Curr. Genet.—1987.—11.—P. 369—375.
63. Nicaud J.-M., Fabre E., Gaillardin C. Expression of invertase activity in *Yarrowia lipolytica* and its use as a selective marker // Curr. Genet.—1989.—16.—P. 253—260.
64. Buckholz R. G., Gleeson M. A. Yeast systems for the commercial production of heterologous proteins // Bio/Technology.—1991.—9.—P. 1067—1072.
65. Sibirny A. A. *Pichia guilliermondii* // Nonconventional yeast in biotechnology / Ed. K. Wolf.—Berlin: Springer, 1996.—P. 255—275.
66. Boretsky Y., Voronovsky A., Liauta-Teglivets O., Hasslacher M., Kohlwein S. D., Shavlovsky G. M. identification of an ARS element and development of a high efficiency transformation system for *Pichia guilliermondii* // Curr. Genet.—submitted.
67. Liauta-Teglivets O., Hasslacher M., Boretsky Y., Kohlwein S. D., Shavlovsky G. M. Molecular cloning of the *G'IP* cyclohydrolase structural gene *RJB1* of *Pichia guilliermondii* involved in riboflavin biosynthesis // Yeast.—1995.—11.—P. 945—952.

УДК 577.21:582.282.23
Надійшла до редакції 17.11.98