ФИЦ Биотехнологии РАН, Институт биохимии им А.Н. Баха,
Лаборатория молекулярной генетики
Московская школа на Юго-Западе № 1543

Дифференциация клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* в составе колоний: изменение уровня содержания высокоэкспрессируемых белков

Е. Бахтеева
С. Фейгин

Научный руководитель:
А. И. Александров, к.б.н., зав. лаб

Москва 2020

Оглавление

Введение.....2
Обзор литературы.....3
Материалы и методы.....9
Результаты.....12
Обсуждение.....22
Выводы.....24
Благодарности.....25
Список литературы.....25

Введение

Пекарские дрожжи (*Saccharomyces cerevisiae*) представляют собой удобный модельный объект для изучения молекулярной биологии эукариотических клеток благодаря высокой скорости размножения и сравнительно низкой требовательности к условиям культивирования. Кроме того, заметная часть генов дрожжей имеет гомологи у большинства эукариотических организмов, в частности, у человека (Botstein et al., 1997). При рассмотрении физиологии дрожжевых клеток чаще всего изучаются отдельные клетки, живущие в жидких средах. Однако также интересны для изучения клетки, входящие в состав многоклеточных образований (таких, как гладкие колонии, плёнки, маты и др.), так как в них проявляются некоторые свойства многоклеточных организмов (Palková, Váchová, 2006). Дело в том, что в таких надклеточных агрегатах условия жизни клеток неодинаковы, и клетки в колониях могут дифференцироваться в результате изменения условий окружающей среды. Такими факторами могут быть концентрации разных веществ, меняющиеся в зависимости от близости субстрата, от наличия или отсутствия контакта с кислородом воздуха, от метаболической активности соседних клеток и от других факторов (Palková et al., 2014). В соответствии с данными условиями меняется морфология конкретных клеток, в частности их размеры, форма (Traven et al., 2012). Морфология колонии в целом тоже подвержена изменениям под влиянием внешней среды (например, при пересаживании колоний диких дрожжей на питательные среды они сглаживали свою неровную поверхность,

заполняя неровности новыми клетками, и становились похожими на колонии, выросшие в лаборатории из лабораторных штаммов (Kuthan, 2003)). Ниже на рис. 1 представлены различные варианты формы дрожжевых колоний.

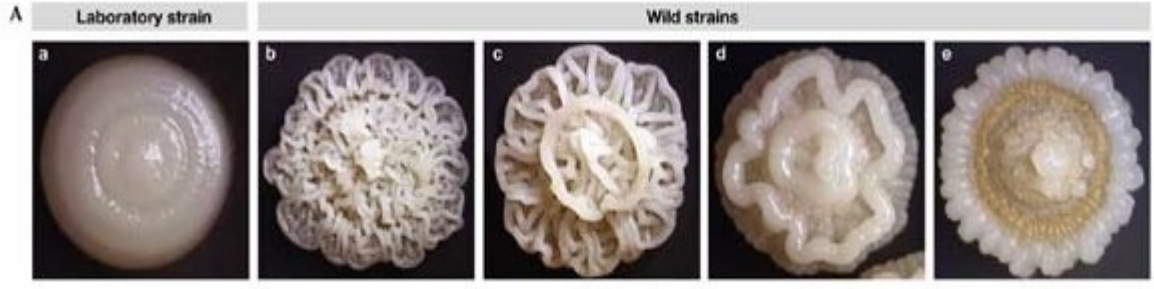

Рис. 1 Различные формы колоний, выращенных в лаборатории (a) и растущих в условиях, приближенных к естественным (b, c, d, e) (Источник: Palková, 2004).

Естественно, что изменения среды отражаются на физиологии, а именно на локализации и уровне содержания некоторых белков (Alexandrov et al., 2019).

В современных исследованиях, благодаря флуоресцентной микроскопии и наличию коллекций штаммов дрожжей, каждый из которых экспрессирует конкретный белок с GFP-меткой, стало возможным рассмотрение особенностей синтеза и локализации любого интересующего нас белка в колониях (Huh et al., 2003). Такие исследования позволяют судить об условиях среды в различных частях колонии, а также делать выводы о роли разных клеток в ней и об особенностях работы данного белка в целом.

Целью нашей работы стало изучение дифференциации клеток дрожжей в колониях путем анализа различий в уровне продукции и локализации GFP-меченых белков в разных частях колонии.

Обзор литературы

Saccharomyces cerevisiae широко используется людьми на протяжении многих лет благодаря своей способности производить спирт из сахаров. Из-за широкого использования и сравнительной простоты культивирования пекарские дрожжи стали одним из наиболее хорошо изученных объектов в молекулярной биологии, и их геном был первым полностью секвенированным геномом эукариот (Cherry et al., 2011). Несмотря

на это, заметная часть генов дрожжей пока не имеет экспериментально определенной функции (Botstein et al., 1997).

Примерно 31% всех генов, кодирующих белки дрожжей, имеют гомологичные гены у млекопитающих (это число примерное, поскольку представления обо всех белках млекопитающих и представителях каждого семейства белков нет) (Botstein et al., 1997). Поэтому изучение дрожжевых клеток может дать представление о работе белков многих эукариотических организмов.

Как и другие микроорганизмы, дрожжи часто сталкиваются с недостатком питательных веществ, недостатком влаги и другими неблагоприятными условиями (Palková et al., 2004). Многоклеточные колонии, за счет своего строения, а также возможности дифференциации клеток, в некоторых случаях помогают микроорганизмам приспосабливаться к голоданию и другим видам стресса (Váchová et al., 2018).

Основные типы колоний

Можно выделить два основных типа дрожжевых колоний, которые отличаются друг от друга строением и демонстрируют разные стратегии защиты. К первому типу относятся гладкие колонии, образованные большинством лабораторных штаммов, и «одомашненные» дикие колонии. Ко второму типу относятся структурированные колонии биопленок, которые образуются дикими штаммами *Saccharomyces cerevisiae* или другими видами дрожжей (Váchová et al., 2018).

Дикие колонии отличаются по морфотипу и физиологии от лабораторных, однако в лабораторных условиях дикие штаммы легко переходят к гладкому морфотипу, который не отличается от морфотипа лабораторных штаммов (рис. 1). Лабораторные штаммы обычно демонстрируют гладкую и плохо структурированную морфологию, в отличие от этого, дикий штамм *S. cerevisiae*, выделенный из природы, образует хорошо структурированные «пушистые» колонии. Архитектура и внутренняя организация двух типов колоний существенно отличается (рис. 2) (Váchová et al., 2018). Гладкие колонии состоят из плотно прилегающих друг к другу клеток, которые не проникают в полутвердую среду (агар) (Váchová et al., 2009), а дикие колонии проникают во внеклеточный матрикс и связаны внеклеточными волокнами (Kuthan, 2003). Между транскриптомами гладких и «пушистых» колоний значительные различия обнаружены в экспрессии около 320 генов (примерно 6% генома дрожжей) (Kuthan, 2003).

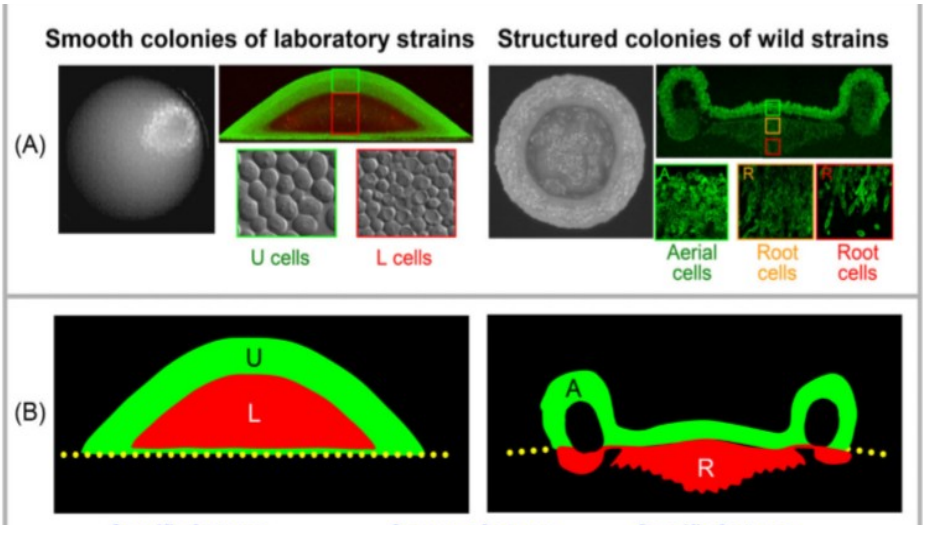

Рис. 2 Дифференциация клеток в лабораторных (слева (A), (B)) и диких (справа (A), (B)) колониях (источник: Váchová et al, 2018).

Рост колоний

Гладкие колонии, растущие на полной среде, проходят через несколько этапов развития, во время которых происходит дифференциация клеток, помогающая адаптироваться к стрессу (Palková et al., 2002). Рост колонии проходит через несколько фаз. Переход из первой фазы (кислой, рост проходит экспоненциально) в фазу производства аммиака (щелочная) сопровождается большими изменениями в экспрессии генов, начинает активно работать метаболизм, помогающий колониям адаптироваться к неблагоприятным условиям (повышенная концентрация аммиака, отдаление многих клеток колонии от субстрата), при которых доступ к питательным веществам ограничен (Palková et al., 2002). После фазы экспоненциального роста наступает фаза, разделяющая колонию на делящиеся клетки, которые оказываются на краю колонии, и неделящиеся клетки, которые находятся в центре (помимо этого, меняется pH среды и в клетках накапливаются сигнальные молекулы аммиака, которые участвуют в последующем метаболическом перепрограммировании колонии и дифференциации клеток (Cap et al., 2012)). В процессе роста меняются и другие показатели, что приводит к более заметным отличиям между краем и центром колонии (Palková et al., 2006) (рис. 3). В клетках края колонии при

GFP-мечении белков Aro4p или Arg1p видны зеленые флуоресцентные сигналы GFP в вакуолях, что говорит о высокой аутофагической активности этих клеток. В центре колонии таких сигналов не наблюдалось. Аутофагия необходима для выживания клеток края колонии (Váchová et al., 2018). Есть и много других отличий, например, клетки края как основной источник энергии используют гликолиз, а клетки центра используют окислительное фосфорилирование (Váchová et al., 2018). Таким образом, известен ряд феноменов, которые указывают на то, что в составе колоний клетки дрожжей могут заметно отличаться, и возможно, эти отличия позволяют клеточной колонии в целом лучше справляться с условиями ее существования.

Однако в данный момент отсутствуют систематические знания, о том, уровни каких именно белков отличаются. Также нет простых методов поиска белков, уровень продукции которых бы отличался.

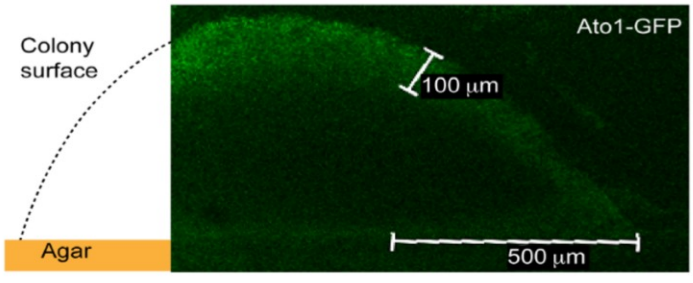

Рис. 3 Белок Ato1 с GFP-меткой экспрессируется во внешнем слое клеток колонии в существенно больших количествах, чем в клетках её центральной части (на фотографии видна часть среза колонии, растущей на агаровой среде) (источник: Traven et al., 2012).

GFP-метки

Зеленый флуоресцентный белок (green fluorescent protein, GFP) – белок, выделенный из медузы *Aequorea victoria*, способный к флуоресценции. Когда GFP освещают светом определенной длины волны (в диапазоне от синего до ультрафиолетового), он высвечивает фотоны в зелёном диапазоне.

Для наблюдения за конкретным белком можно модифицировать клетки так, чтобы они синтезировали нужный белок с GFP-меткой. Существуют коллекции штаммов дрожжей, каждый из которых синтезирует определенный белок, слитый с GFP (Huh et al., 2003). Для получения таких штаммов используются дрожжи без гена HIS3, который необходим для роста на синтетической среде без источника гистидина. К открытой рамке считывания с помощью гомологичной рекомбинации присоединяют последовательность, кодирующую GFP, а также функциональный ген HIS3 (рис. 4A), позволяющий клеткам, в которых произошла интеграция фрагмента ДНК, расти на среде без гистидина. Затем с помощью ПЦР выжившие колонии проверяют на корректную вставку (рис. 4B). Финальная проверка проводится уже на микроскопе, где проверяют, фуоресцирует ли нужный белок (Howson et al, 2005).

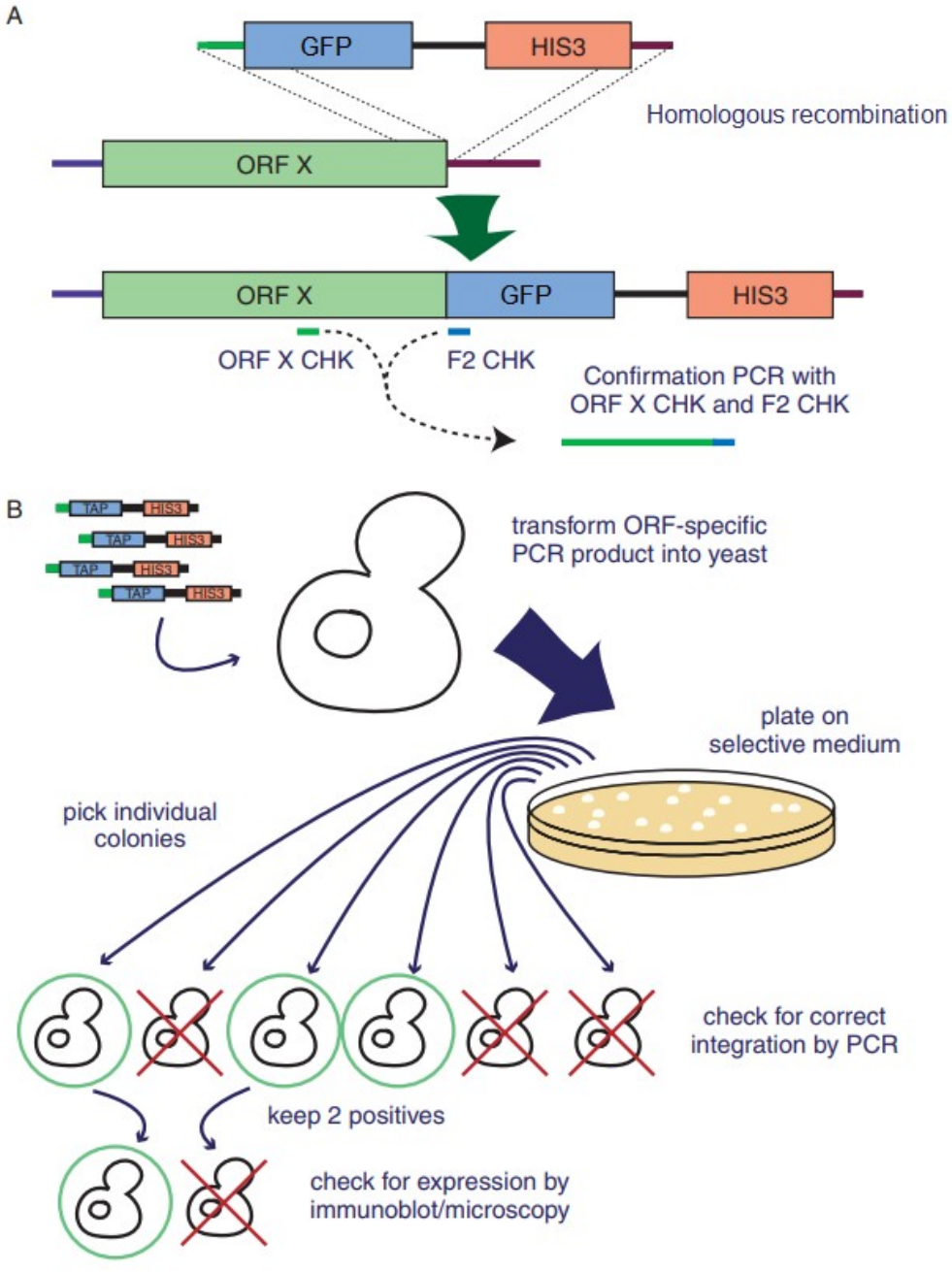

Рис. 4 Принцип производства белков, связанных с GFP. А - Метка GFP и маркерный ген (HIS3), полученные в результате ПЦР, вставлены в участок каждого ORF с помощью гомологичной рекомбинации, в результате синтезируется GFP-меченный белок (источник yeastgfp.yeastgenome.org с изменениями). В – Проверка выживших колоний на корректную вставку.

Таким образом цель нашего исследования была изучить различия в уровне продукции разных белков в разных частях дрожжевых колоний.

Для этого мы поставили следующие задачи:

1) С использованием штаммов, содержащих меченные GFP белки, проверить возможность применения проточной цитометрии для обнаружения белков, у которых наблюдается заметные количественные отличия в разных частях колонии

2) Исследовать возможные отличия в уровне продукции белков в разных частях колонии

Материалы и методы

Культивирование колоний

Дрожжевые культуры выращивали на твердой среде YPD. Для ее приготовления смешивали дрожжевой экстракт (1%), пептон (2%), глюкозу (2%) и агар (2%), готовую смесь заливали дистиллированной водой, затем смесь автоклавировали 20 минут при 121 градусе Цельсия. Готовую среду разливали по чашкам Петри сразу, или же, при работе с затвердевшей средой, нагревали в микроволновой печи, не давая ей закипеть. Затем заливали смесь в чашку Петри и оставляли до полного застывания среды. Чашку Петри расчерчивали на 8 частей, в каждую из которых на поверхность агара с помощью зубочистки наносили небольшие точки суспензии дрожжей, после чего подписывали название каждого штамма. Далее чашку Петри накрывали крышкой и оставляли в термостате при температуре +30°C на два дня (в перевернутом виде, т.е. крышкой вниз). В течение этого времени клетки делились, образовывая колонии (рис. 5). Такие колонии далее использовались для других экспериментов. Для опытов по цитометрии многочисленных колоний также использовался метод инокуляции колоний с помощью стерильных пластмассовых репликаторов с 96 шпильками.

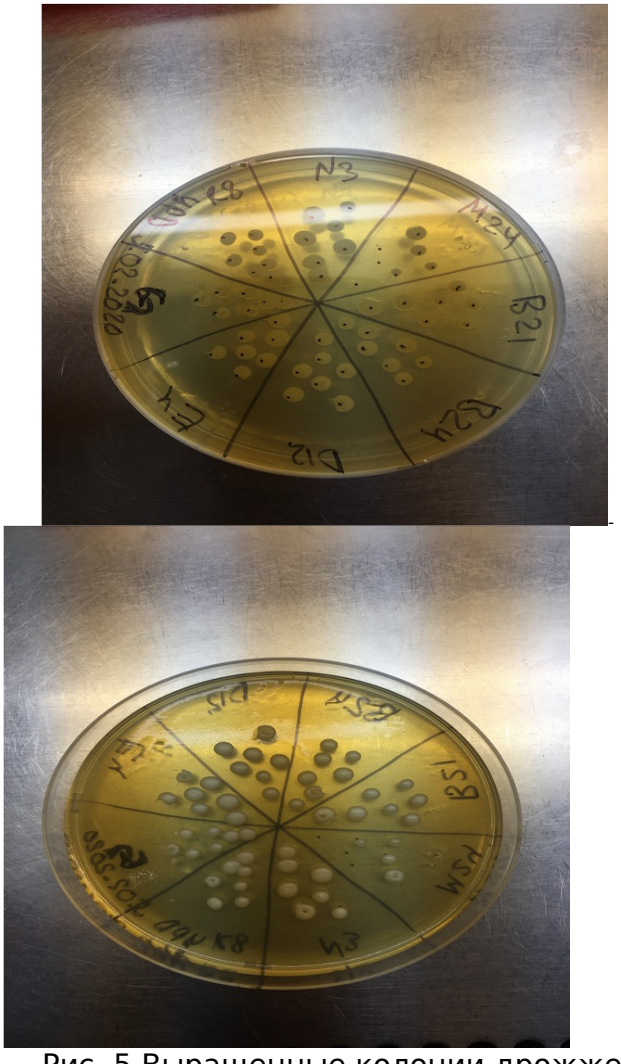

Рис. 5 Выращенные колонии дрожжей на твердой среде YPD.

Флуоресцентная микроскопия

Водный раствор агара (2%) нагревали в микроволновой печи, не доводя до кипения, изготавливали пластинку и клали ее на предметное стекло (Alexandrov et al., 2019). Петлей брали часть колонии (край или центр), размешивали в воде и помещали каплю на агаровую пластинку. Так проделывали с каждым штаммом. Накрывали покровным стеклом и сверху капали иммерсионным маслом. Для рассмотрения клеток использовали флуоресцентный микроскоп Zeiss Axioskop 40 с объективом 40х и окуляром 10х, для фокусировки на клетках использовали макро- и микровинт.

Изготовление срезов колоний

Для изготовления срезов колоний мы отделяли часть агаровой среды, на которой росла нужная колония, разрезали её на две части при помощи покровного стекла. В это время на другое

покровное стекло мы помещали каплю остуженного, но ещё жидкого двухпроцентного раствора агара. Затем до застывания агара мы помещали это стекло каплей вниз на поверхность среза колонии. В дальнейшем при застывании агар предотвращал смещение покровного стекла и смазывание слоёв клеток.

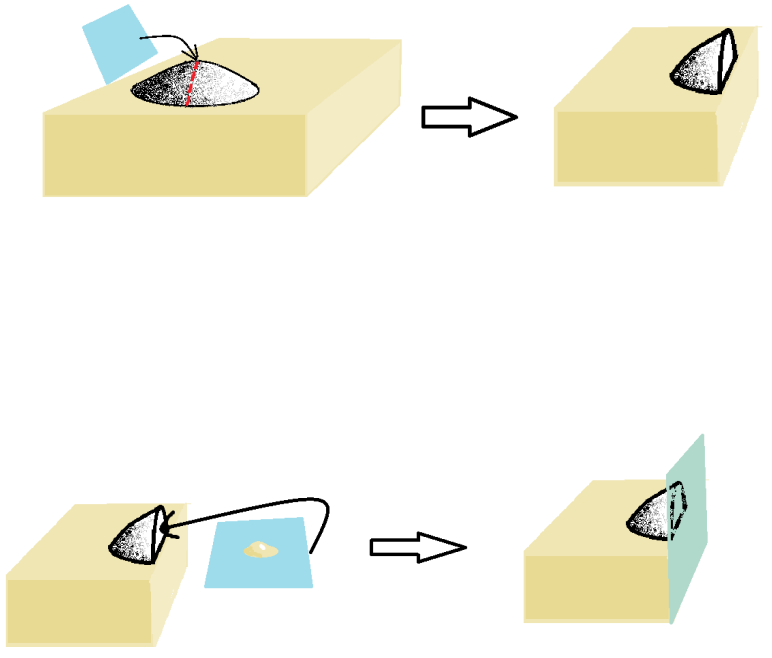

Рис. 6 Методика изготовления срезов колоний.

Метод проточной цитометрии

- *Принцип работы проточного цитометра*

Проточная цитометрия – метод, позволяющий анализировать различные популяции клеток, исследуя каждую клетку по отдельности. В основе работы проточного цитометра лежит гидродинамическая фокусировка - процесс, при котором суспензия клеток проходит в проточную ячейку, а затем попадает в поток обжимающей жидкости. Из-за разности давления между клетками и обжимающей жидкостью, поток сужается до диаметра одной клетки, после чего поток облучается светом лазера. Лазерный луч возбуждает флуоресценцию различных молекул внутри или снаружи клеток. Сигналы флуоресценции от каждой клетки улавливают детекторы, после чего эти данные появляются на компьютере в виде точечной диаграммы или гистограммы. Диаграммы визуализируют только один оптический параметр. В результате генерируется кривая, описывающая распределение клеток в соответствии с интенсивностью сигнала.

Точечные диаграммы помогают визуализировать два оптических параметра на одном графике. Клетки с одинаковыми параметрами накапливаются в одном месте графика, благодаря чему можно увидеть разные клеточные популяции. Кроме того, наибольшая плотность клеток на таком графике выделена цветом (тепловая карта), что может более точно говорить о разделении клеток на разные популяции.

- *Ход работы*

С помощью петли клетки с края колонии или всю колонию целиком смешивали с дистиллированной водой в 1.5 мл пробирке. Пробирку с суспензией помещали в проточный цитометр MacsQuant Analyser10. Для исследования флуоресценции GFP использовали возбуждающий свет с длиной волны 488 нм (синий), фильтр исходящего света 520/50 нм. После анализа определённого числа клеток формируется точечная диаграмма, показывающая зависимость интенсивности флуоресценции от размера клеток. Полученные графики обрабатывали в программе FlowJo.

Результаты

Сравнение флуоресценции клеток края колонии с флуоресценцией клеток всей колонии

При помощи проточной цитометрии мы проанализировали интенсивность флуоресценции 35 химерных белков в колониях дрожжей. Поскольку данный метод исследования дифференциации клеток дрожжей применялся впервые, мы использовали белки с высокими уровнями продукции, для облегчения интерпретации результатов цитометрических экспериментов (Ghaemmaghami et al., 2003). При этом мы брали пробы целой колонии и края колонии отдельно. По полученным результатам исследуемые белки удалось разделить на несколько групп. Ниже, перед рассмотрением отдельных групп, приведена гистограмма для лишённого GFP-меток штамма дрожжей. К сожалению, контрольная группа по техническим причинам была проанализирована только для одних настроек цитометра и не может сравниваться с 8 из проанализированных белков (EFT2, GCV3, GRS1, HTA2, NAB2, NFS1, PGM2, UBC4).

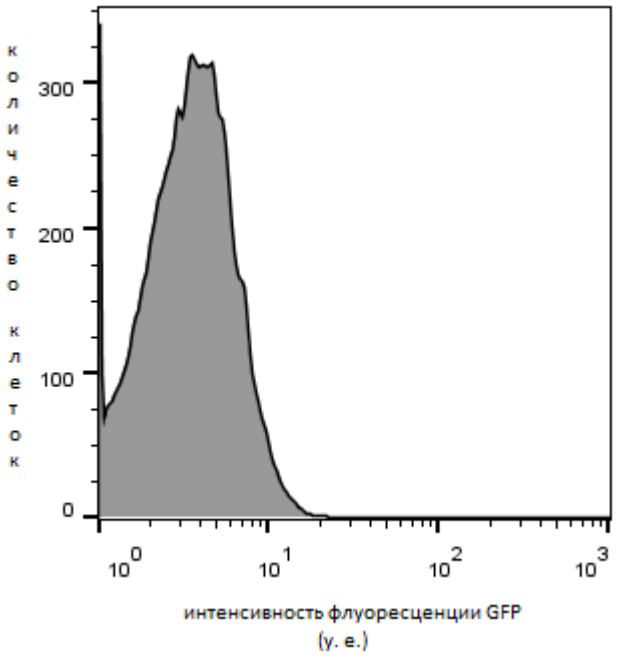

Рис 7. На рисунке изображена гистограмма интенсивности флуоресценции GFP для штамма дрожжей, лишённого GFP-меток.

Группа № 1 «Высокий уровень на краю»

В этой группе при анализе всей колонии клетки распределялись по двум популяциям, одна из которых светилась заметно ярче другой. Клетки же края колонии практически все оказывались близкими по яркости свечения к наиболее яркой из этих популяций. В эту группу попали следующие белки: CDC60, EFT2, ENO1, FPR1, FUN12, GCV3, GRS1, LYS2, RIM15, RPB10, RPL1A, SAC6, SSZ1, YEF3. Сюда же попали белки, для которых яркость клеток края несколько выше яркости самой яркой из популяции всей колонии* - HOR7, RPL41A, PGK1

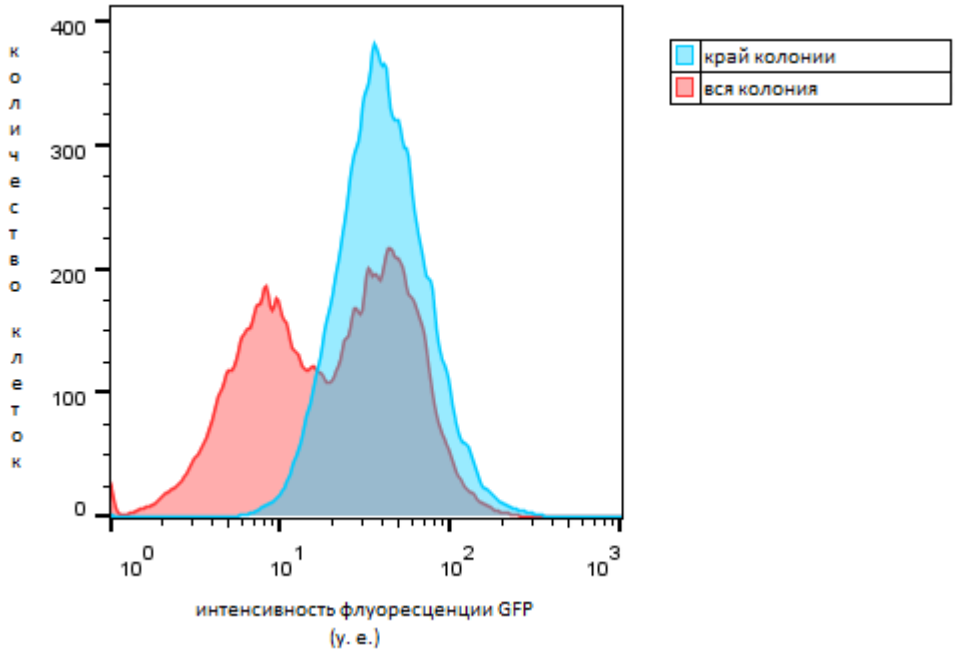

Рис 8. На рисунке изображена гистограмма интенсивности флуоресценции GFP для белка RIM15, как типичного представителя группы №1. Как видно, пик, соответствующий клеткам края колонии (голубой), совпадает по оси интенсивности флуоресценции с пиком самой яркой популяции всей колонии (розовый).

Группа №2 «Две верхние популяции»

В эту группу попали белки, для которых при анализе всей колонии можно выделить три популяции, а на краю колонии клетки по флуоресценции распределяются по двум популяциям, близким к двум ярчайшим популяциям всей колонии. К этой группе м отнесли HTA2 и RPS30B

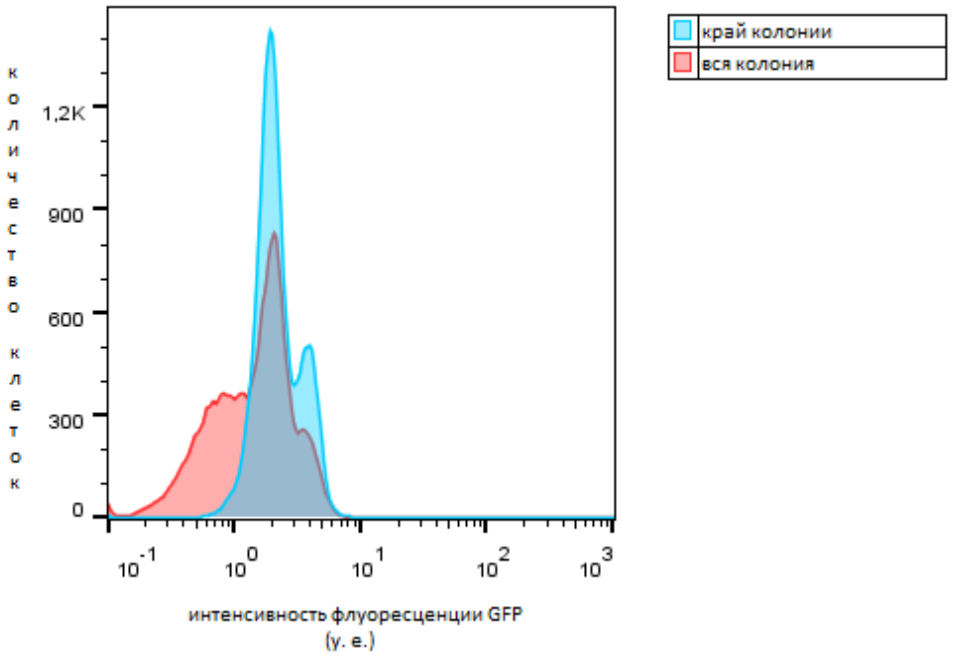

Рис. 9 На рисунке изображена гистограмма интенсивности флуоресценции GFP для белка HTA2, как типичного представителя группы №2. Как видно, пики, соответствующие клеткам края колонии (голубые), совпадают по оси интенсивности флуоресценции с двумя ярчайшими пиками всей колонии (розовые).

Группа №3 «Верхняя половина»

Группа, сходная с группой № 1, отличается тем, что в колонии нельзя чётко выделить популяции, а клетки края флуоресцируют, как клетки более яркой половины (не популяции) всей колонии. Сюда мы отнесли ARO8, SNA2, TIF3

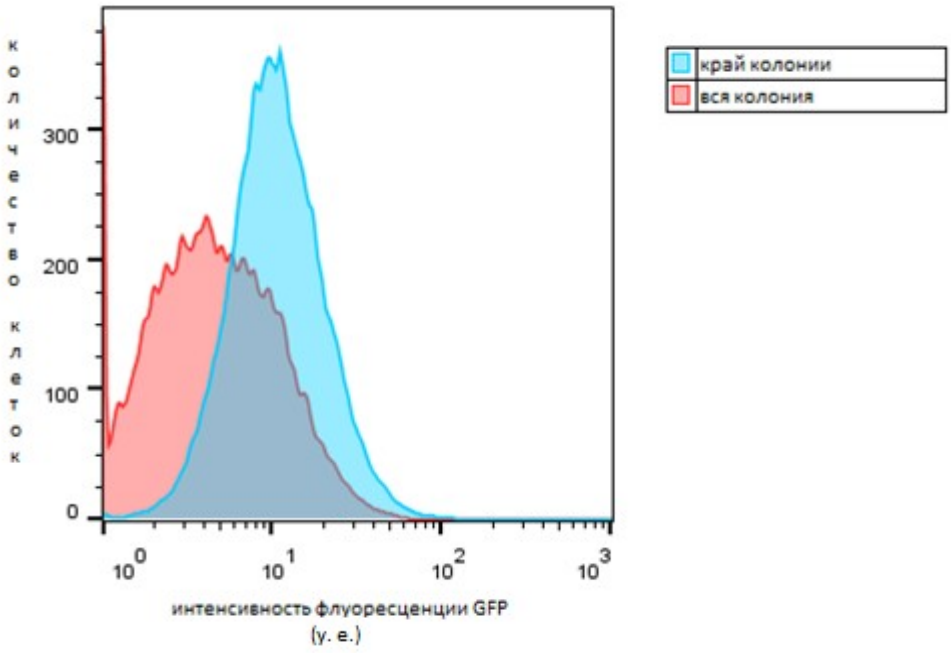

Рис. 10 На рисунке изображена гистограмма интенсивности флуоресценции GFP для белка ARO8, как типичного представителя группы №3. Как видно, пик, соответствующий клеткам края колонии (голубой), смещён вправо по оси интенсивности флуоресценции по отношению к пику всей колонии (розовый).

Группа №4 «Ярче»

В этой группе у клеток мы не наблюдали чёткого разделения на популяции ни во всей колонии, ни с её края. Однако клетки края показывали заметно более высокую степень флуоресценции. К этой группе мы отнесли ARG1, RPS25B, RPS29B. От предыдущей группы отличается тем, что формы пиков у всей колонии и с её края совпадают.

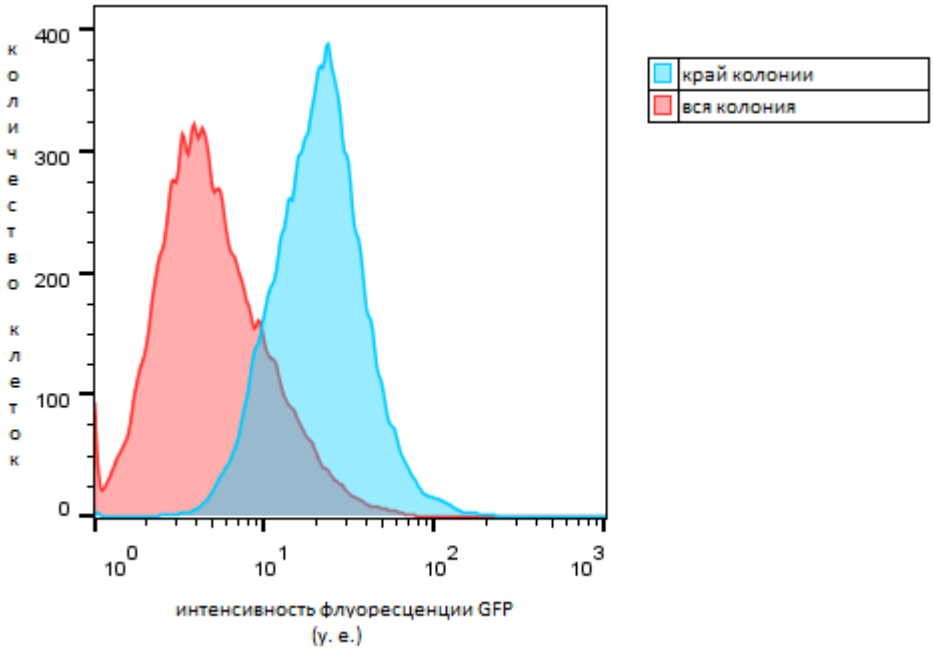

Рис. 11 На рисунке изображена гистограмма интенсивности флуоресценции GFP для белка RPS25B, как типичного представителя группы №4. Как видно, пик, соответствующий клеткам края колонии (голубой), значительно сдвинут вправо.

Группа №5 «Без различий»

В этой группе мы не наблюдали различий в степени флуоресценции клеток всей колонии и клеток её края. При этом ни у одного из этих белков мы не обнаружили разделения клеток на популяции по яркости ни во всей колонии, ни с её края. В эту группу попали следующие белки: NAB2, NFS1, PGM2, SER1, UBC4.

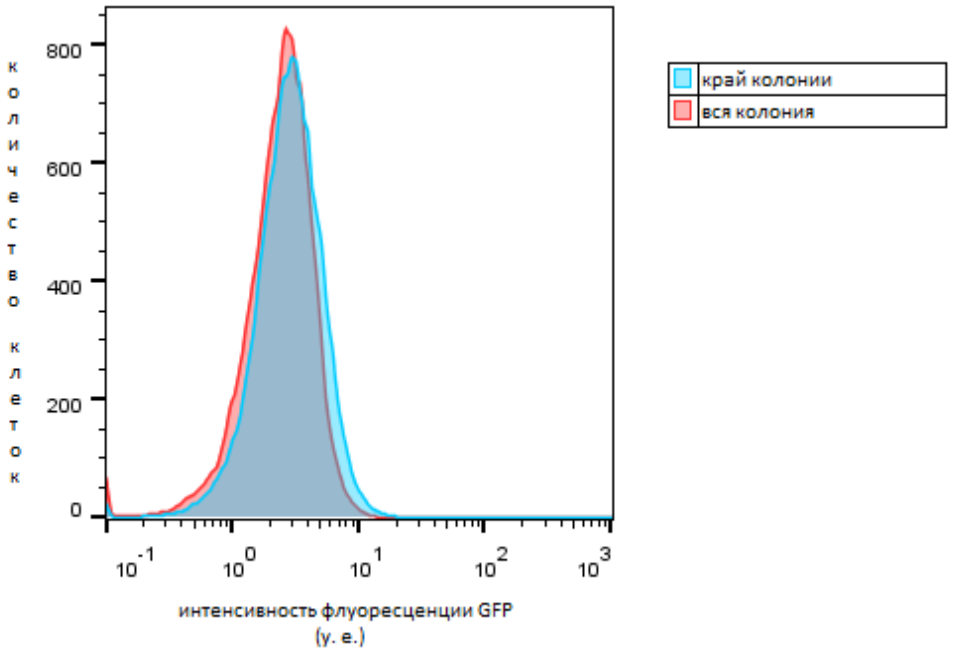

Рис. 12 На рисунке изображена гистограмма интенсивности флуоресценции GFP для белка NAB2, как типичного представителя группы №5. Как видно, пик, соответствующий клеткам края колонии (голубой), совпадает по оси интенсивности флуоресценции с пиком всей колонии (розовый).

Группа №6 «Нижняя популяция»

В этой группе клетки края колонии по степени флуоресценции были наиболее близки к наименее яркой из популяций всей колонии. При этом количество популяций не обязательно равно двум. В эту группу попал белок RPP1B. Сюда же мы относим белок RPL7A, для которого флуоресценция клеток края колонии ниже флуоресценции наименее яркой популяции всей колонии*.

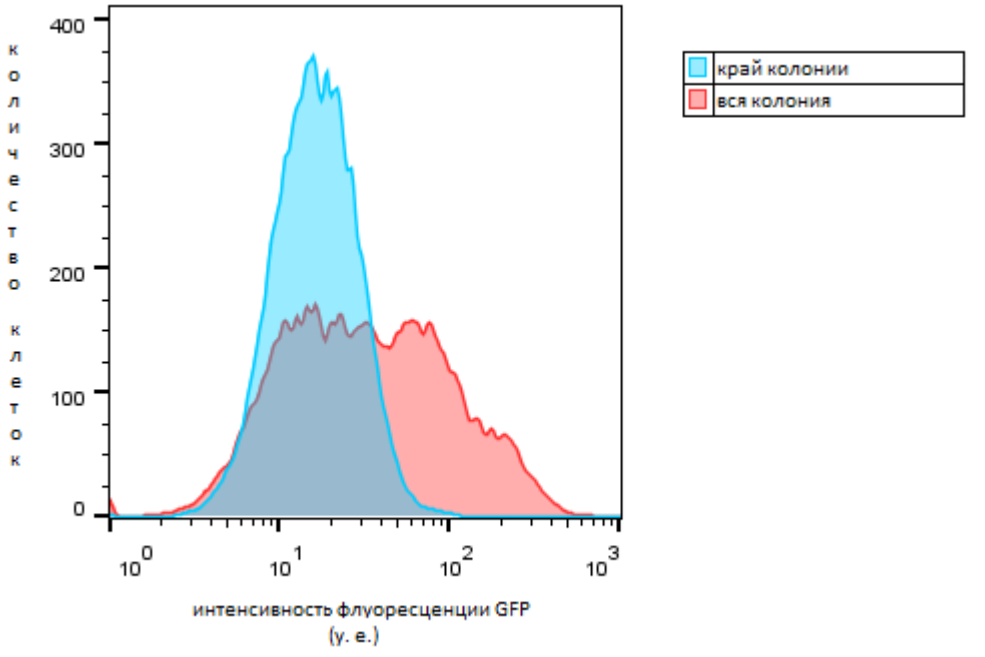

Рис. 13 На рисунке изображена гистограмма интенсивности флуоресценции GFP для белка RPP1B, как типичного представителя группы №6. Как видно, пик, соответствующий клеткам края колонии (голубой), совпадает по оси интенсивности флуоресценции с пиком самой тусклой популяции всей колонии (розовый).

Оставшиеся 3 белка не попадают ни в одну из рассмотренных групп, поэтому их гистограммы приведены ниже

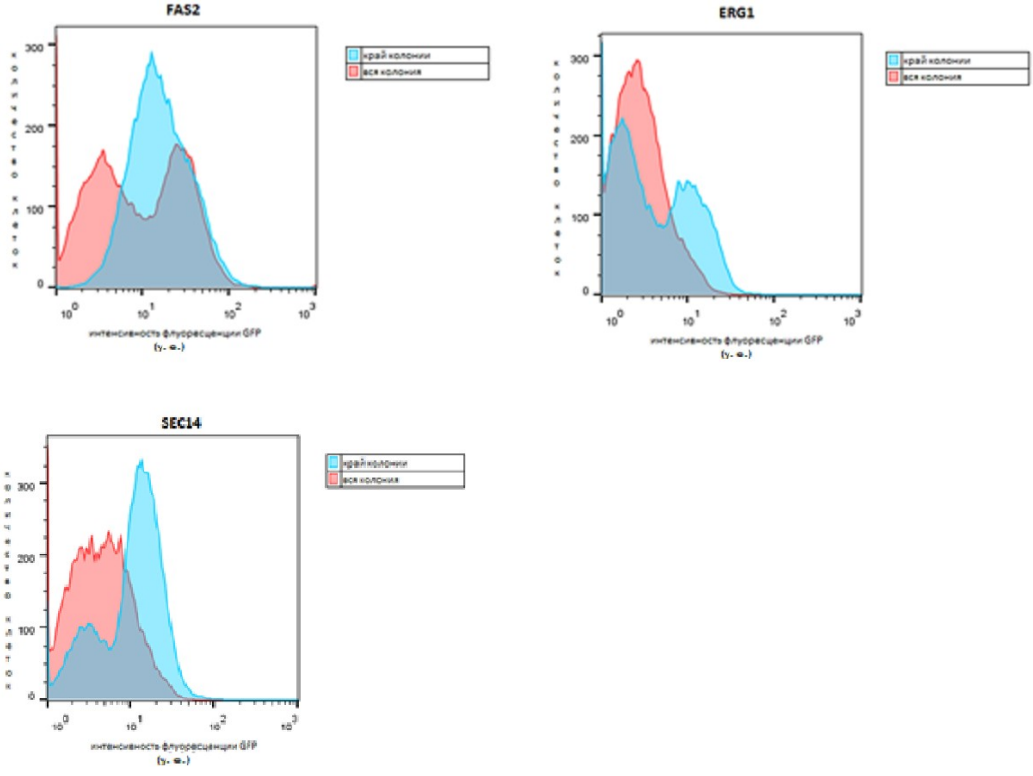

Рис. 14 На рисунке изображены гистограммы для трёх белков, не попавших в выделенные нами группы.

*Колонии, которые мы брали для проб целой колонии и края колонии были разного возраста (3 дня и 2 дня соответственно), чем могут объясняться сдвиги популяции края относительно всех популяций целой колонии, поскольку дифференциация клеток в колонии происходит с течением времени (Palková et al., 2006).

Сравнение флуоресценции клеток края колонии с флуоресценцией клеток всей колонии

Для восьми белков мы также брали пробы из центра колонии. По результатам их анализа мы смогли разделить наши белки на две группы.

Группа №1

Белки, попавшие в предыдущем разделе в группу №5 (не имевшие различий в интенсивности флуоресценции на краю и во всей колонии и не разбивавшиеся на популяции), не давали различий во флуоресценции между всей колонией и центром колонии (NAB2, NFS1, PGM2, UBC4).

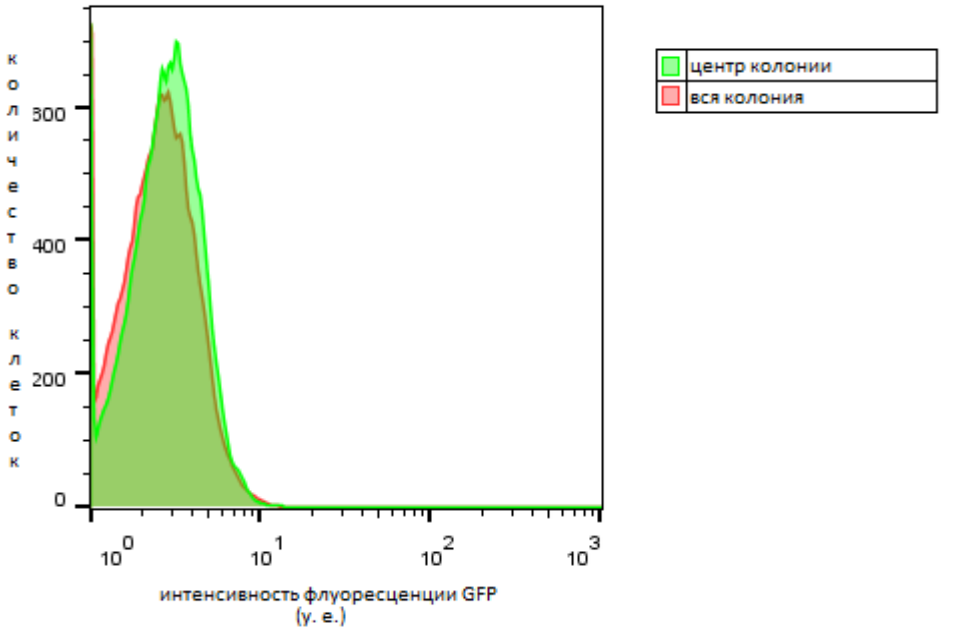

Рис. 15 На рисунке изображена гистограмма интенсивности флуоресценции GFP для белка NAB2, как типичного представителя группы №1. Как видно, пик, соответствующий клеткам центра колонии (зелёный), совпадает по оси интенсивности флуоресценции с пиком всей колонии (розовый).

Группа №2

Белки, по флуоресценции которых колонии можно было разделить на популяции, давали слабые различия между флуоресценцией всей колонии и центра: во всех случаях все популяции целой колонии были представлены и в её центре. В эту группу попали следующие белки: EFT2, GCV3, GRS1, HTA2.

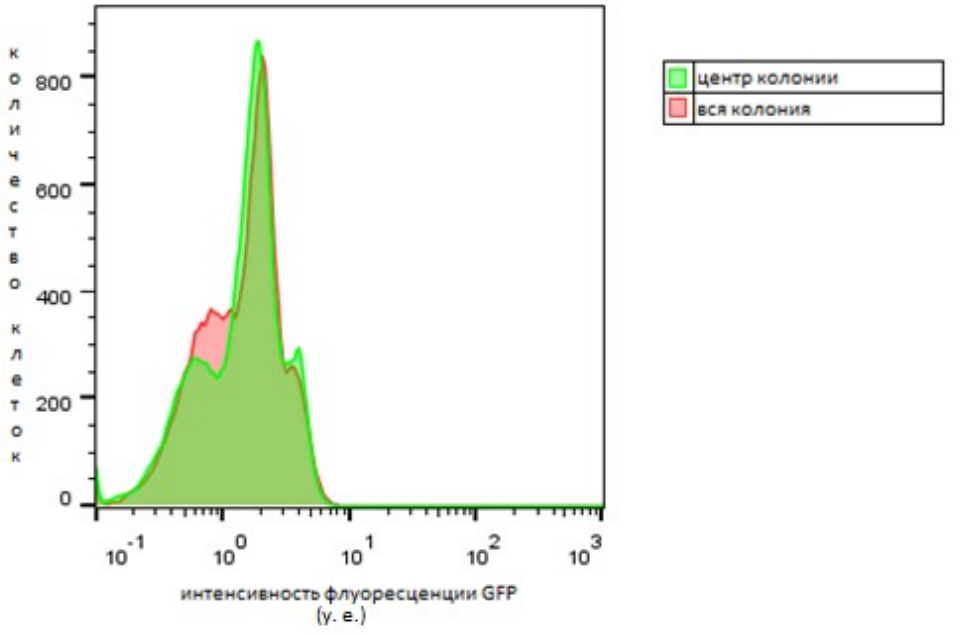

Рис. 16 На рисунке изображена гистограмма интенсивности флуоресценции GFP для белка HTA2, как типичного представителя группы №2. Как видно, пики, соответствующие клеткам центра колонии (зелёные), практически совпадают по оси интенсивности флуоресценции с пиками всей колонии (розовые).

Обсуждение

Подготовка проб

Для большой группы белков (27) колонии, которые брали для анализа целой колонии, и те, которые брали для анализа края колонии, по техническим причинам различались по возрасту (3 дня и 2 дня с момента посева соответственно). Этим могут объясняться сдвиги популяций края относительно всех популяций целой колонии. Возможно, этим же объясняется наличие выделенной нами группы «ярче», где популяций во всей колонии и на краю нет, но клетки края флуоресцируют заметно сильнее; тогда эти белки вероятнее всего оказались бы в группе «без различий». На такую возможность указывает и то, что среди 8 белков, для которых возраст колоний для проб был одинаков, нет ни одного белка, отнесённого к группе «ярче».

В начале нашей работы мы искали различия по флуоресценции клеток колоний при помощи флуоресцентной микроскопии (см. материалы и методы). Однако такой метод занимает значительно

больше времени и даёт менее точные данные. Поэтому в работе мы используем только данные цитометрии.

Также мы использовали метод поперечного среза колонии, уже опробованный в других исследованиях (Traven et al., 2012) (см. материалы и методы). Но полученные данные, во-первых, были немногочисленны, во-вторых, неточны, поскольку нам не удалось решить проблему свечения среды, на которой росли колонии.

Анализ данных

При анализе данных мы не использовали статистических методов при оценке неоднородности проб по флуоресценции клеток и не анализировали степень различий во флуоресценции клеток из разных проб. Использование этих методов может позволить чётче разделять массив клеток на популяции и определять количественные различия в уровне экспрессии белков. Также мы не исследовали временной динамики дифференциации клеток по рассмотренным белкам, что могло бы дать представление о развитии колонии и о том, в какой момент появляются различия в продукции данного белка.

Различие в сигнале GFP могло бы быть обусловлено разницей в размерах клеток, однако есть белки, не имеющие отличий в интенсивности сигнала, что говорит о незначительности этого параметра. К тому же мы провели анализ размеров клеток на краю и во всей колонии и существенных различий не обнаружили (см рис. 17).

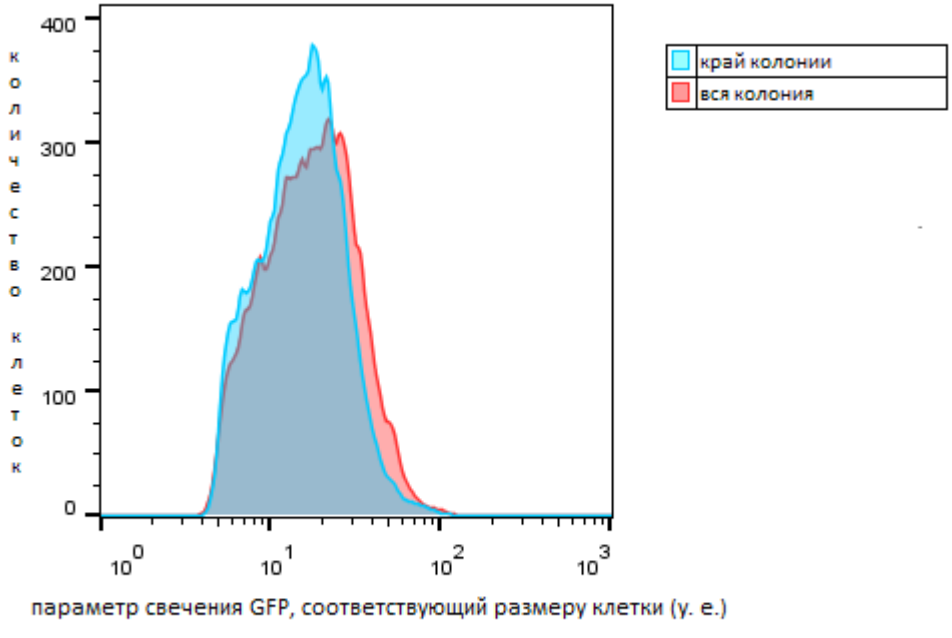

Рис. 17 На рисунке изображена гистограмма свечения GFP для белка RIM15. Как видно, пик, соответствующий клеткам всей колонии (розовый), практически совпадает по оси абсцисс с пиком края колонии (голубой). На оси абсцисс отложен параметр свечения, соответствующий размеру клетки.

Также различие между центральными клетками и клетками края могли возникнуть из-за низкой концентрации кислорода, необходимого для созревания GFP (Váchová et al., 2018, Palkova et al., 2014), в центре колонии, но стоит отметить, что белок HTA2 как с краю, так и в центре колонии давал два пика интенсивности, различающихся по яркости в 2 раза (ожидаемый результат, поскольку количество гистона в клетке пропорционально количеству ДНК (Kolodrubetz et al, 1982), а в дрожжевой колонии есть диплоидные и гаплоидные клетки). Данный факт косвенно свидетельствует о том, что кислорода в центре колонии достаточно для созревания GFP. Однако точно на данный вопрос можно ответить экспериментально, культивируя клетки в условиях низкого содержания кислорода и измеряя уровень белка в них.

В некоторых случаях результаты по цитометрии изученных нами белков можно объяснить (например, белок HTA2 – гистон, количество которого в клетке пропорционально количеству ДНК – во всей колонии давал три пика, которые, можно предположить, соответствуют мёртвым, гаплоидным и диплоидным клеткам соответственно (по возрастанию яркости)). Тем не менее, мы не обнаружили регулярного соответствия между функцией белка и группой, к которой мы его относим.

Выводы

1) Большинство рассмотренных нами белков давали более интенсивное свечение GFP-меток на краю колонии, чем в колонии в целом (25 из 35 белков) (Для высоко экспрессируемых белков клетки края колонии чаще всего содержат больше белка, чем центральные части колонии).
2) Ни в одном из рассмотренных нами случаев при сравнении интенсивности флуоресценции клеток всей колонии и её центра существенных различий мы не обнаружили (для высоко экспрессируемых белков центр колонии не имеет существенных отличий от колонии в целом по содержанию этих белков).
3) Нами опробован метод исследования дифференциации клеток дрожжей в составе колоний с помощью проточной цитометрии клеток, продуцирующих химерные белки, слитые с GFP.

Благодарности

Мы благодарим А. И. Александрова за научное руководство, С.М. Глаголева и других сотрудников биокафедры школы №1543 за организацию лабораторной практики, сотрудников лаборатории молекулярной генетики института биохимии им. А.Н. Баха: А. А. Дергалёва, В. Бидюк, Э. В. Гросфельд и О. В. Митькевич за методическую помощь в выполнении работы.

Список литературы

A.I. Alexandrov et al. Analysis of novel hyperosmotic shock response suggests ‘beads in liquid’cytosol structure //Biology open. – 2019. – Т. 8. – №. 7. – С. bio044529.

Botstein D., Chervitz S. A., Cherry M. Yeast as a model organism //Science. – 1997. – V. 277. – №. 5330. – P. 1259-1260.

Čáp M., Váchová L., Palková Z. Yeast colony survival depends on metabolic adaptation and cell differentiation rather than on stress defense //Journal of Biological Chemistry. – 2009. – Т. 284. – №. 47. – С. 32572-32581.

Cherry J. M. et al. Saccharomyces Genome Database: the genomics resource of budding yeast //Nucleic acids research. – 2012. – Т. 40. – №. D1. – С. D700-D705.

FlowJo™ Software for Windows Version *X*. Ashland, OR: Becton, Dickinson and Company; 2019.

Ghaemmaghami S. et al. Global analysis of protein expression in yeast //Nature. – 2003. – Т. 425. – №. 6959. – С. 737-741.

Howson J. M. M. et al. Comparison of population-and family-based methods for genetic association analysis in the presence of interacting loci //Genetic Epidemiology: The Official Publication of the International Genetic Epidemiology Society. – 2005. – Т. 29. – №. 1. – С. 51-67.

Huh W. K. et al. Global analysis of protein localization in budding yeast //Nature. – 2003. – Т. 425. – №. 6959. – С. 686-691.

Kolodrubetz D., Rykowski M. C., Grunstein M. Histone H2A subtypes associate interchangeably in vivo with histone H2B subtypes //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1982. – Т. 79. – №. 24. – С. 7814-7818.

Kuthan M. et al. Domestication of wild Saccharomyces cerevisiae is accompanied by changes in gene expression and colony morphology //Molecular microbiology. – 2003. – V. 47. – №. 3. – P. 745-754.

Marinkovic Z. S. et al. A microfluidic device for inferring metabolic landscapes in yeast monolayer colonies //Elife. – 2019. – T. 8. – C. e47951.

Palková Z. et al. Ammonia pulses and metabolic oscillations guide yeast colony development //Molecular biology of the cell. – 2002. – T. 13. – №. 11. – C. 3901-3914.

Palková Z. Multicellular microorganisms: laboratory versus nature //EMBO reports. – 2004. – V. 5. – №. 5. – P. 470-476.

Palková Z., Váchová L. Life within a community: benefit to yeast long-term survival //FEMS microbiology reviews. – 2006. – V. 30. – №. 5. – P. 806-824.

Palková Z., Wilkinson D., Váchová L. Aging and differentiation in yeast populations: elders with different properties and functions //FEMS yeast research. – 2014. – V. 14. – №. 1. – P. 96-108.

Traven A. et al. Transcriptional profiling of a yeast colony provides new insight into the heterogeneity of multicellular fungal communities //PLoS One. – 2012. – V. 7. – №. 9.

Váchová L. et al. Metabolic diversification of cells during the development of yeast colonies //Environmental microbiology. – 2009. – T. 11. – №. 2. – C. 494-504.

Váchová L., Palková Z. How structured yeast multicellular communities live, age and die? //FEMS yeast research. – 2018. – T. 18. – №. 4. – C. foy033.