

ІТМО

В.А. ИВАНОВА

**МОРФОЛОГИЯ ДРОЖЖЕЙ.
ТИНКТОРИАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ
ИССЛЕДОВАНИЯ**



**Санкт-Петербург
2026**

**МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ**

УНИВЕРСИТЕТ ИТМО

В.А. Иванова

**МОРФОЛОГИЯ ДРОЖЖЕЙ.
ТИНКТОРИАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ
ИССЛЕДОВАНИЯ**

УЧЕБНОЕ ПОСОБИЕ

РЕКОМЕНДОВАНО К ИСПОЛЬЗОВАНИЮ В УНИВЕРСИТЕТЕ ИТМО

по направлению подготовки 19.03.01 Биотехнология в качестве учебного пособия
для реализации основных профессиональных образовательных программ высшего
образования бакалавриата

ИТМО

Санкт-Петербург

2026

Иванова В.А., Морфология дрожжей. Тинкториальные методы исследования – СПб: Университет ИТМО, 2026. – 53 с.

Рецензент(ы):

Савкина Олеся Александровна, кандидат технических наук, ведущий научный сотрудник, СПбФ ФГАНУ НИИХП;

В учебном пособии рассмотрены современные представления о морфологии промышленно используемого вида дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Пособие предназначено для обучающихся по направлению подготовки 19.03.01 Биотехнология при изучении дисциплин «Общая микробиология», «Пищевая микробиология». Пособие помогает сформировать базовые знания о морфологии эукариотических клеток дрожжей, необходимые для понимания физиологических особенностей данных микроорганизмов. В пособии даны методические указания к проведению лабораторных работ с использованием тинкториальных методов исследования.

The logo of ITMO University, consisting of the letters 'ITMO' in a bold, black, sans-serif font. The letter 'I' has a small dot above it.

ИТМО (Санкт-Петербург) — национальный исследовательский университет, научно-образовательная корпорация. Альма-матер победителей международных соревнований по программированию. Приоритетные направления: IT и искусственный интеллект, фотоника, робототехника, квантовые коммуникации, трансляционная медицина, Life Sciences, Art&Science, Science Communication.

Лидер федеральной программы «Приоритет-2030», в рамках которой реализуется программа «Университет открытого кода». С 2022 ИТМО работает в рамках новой модели развития — научно-образовательной корпорации. В ее основе академическая свобода, поддержка начинаний студентов и сотрудников, распределенная система управления, приверженность открытому коду, бизнес-подходы к организации работы. Образование в университете основано на выборе индивидуальной траектории для каждого студента.

ИТМО пять лет подряд — в сотне лучших в области Automation & Control (кибернетика) Шанхайского рейтинга. По версии SuperJob занимает первое место в Петербурге и второе в России по уровню зарплат выпускников в сфере IT. Университет в топе международных рейтингов среди российских вузов. Входит в топ5 российских университетов по качеству приема на бюджетные места. Рекордсмен по поступлению олимпиадников в Петербурге. С 2019 года ИТМО самостоятельно присуждает ученые степени кандидата и доктора наук.

© Университет ИТМО, 2026

© Иванова В.А., 2026

Введение

Дрожжи представляют собой обширную и разнообразную группу одноклеточных эукариотических микроорганизмов, широко распространённых в природе и играющих важную роль в хозяйственной деятельности человека. Благодаря выраженным адаптационным способностям, уникальным метаболическим характеристикам и безопасности дрожжи рода *Saccharomyces* занимают лидирующие позиции среди микроорганизмов-продуцентов, используемых в пищевой промышленности, и являются одной из ключевых модельных систем в клеточной и молекулярной биологии.

Эффективное управление биотехнологическими процессами — будь то классическое брожение, синтез рекомбинантных белков или получение биологически активных добавок — невозможно без детального понимания микроморфологии продуцента. Изменения состава питательной среды и условий культивирования закономерно отражаются на ультраструктуре клетки. В свою очередь, морфологические изменения служат важными индикаторами физиологического состояния дрожжей при воздействии различных факторов среды.

Важное место в исследовании микроморфологии дрожжевых клеток занимают тинкториальные методы, основанные на применении различных красителей для выявления структурных особенностей клетки. Эти подходы позволяют визуализировать отдельные клеточные компоненты, оценивать их функциональное состояние, а также выявлять физиологические изменения, возникающие в процессе жизнедеятельности микроорганизмов. Тинкториальные методы широко применяются в учебной и производственной практике, а также в научных исследованиях.

Настоящее учебное пособие направлено на формирование у обучающихся системных знаний о морфологии дрожжей и основных методах их микроскопического исследования. В первой главе рассматриваются морфотипы дрожжей, приводятся сведения о строении, функциях, динамике развития и наследования основных клеточных структур. Во второй главе представлены лабораторные работы, направленные на освоение тинкториальных методов микроскопического исследования дрожжей. Практикум включает:

- исследование морфологии митохондрий в клетках дрожжей;
- изучение вакуолей как индикаторов стрессоустойчивости и клеточного гомеостаза;
- анализ запасных питательных веществ;
- оценку степени автолиза клеток — важного параметра при производстве кормовых и биологически активных добавок, а также дрожжевых экстрактов.

Учебное пособие предназначено для обучающихся по направлению подготовки 19.03.01 Биотехнология при изучении дисциплин «Общая микробиология» и «Пищевая микробиология». Данные учебные курсы

включают лекционные, практические и лабораторные занятия. Пособие помогает сформировать базовые знания о морфологии эукариотических клеток дрожжей, необходимые для понимания физиологических особенностей данных микроорганизмов. Практическая часть пособия помогает освоить тинкториальные методы исследования дрожжей, приобрести навыки работы с микроорганизмами и микробиологическим оборудованием. В конце каждой главы приведены контрольные вопросы, позволяющие обучающимся самостоятельно оценить степень освоения изученного материала.

Учебное пособие раскрывает возможности практического применения тинкториальных методов исследования дрожжей и подходы к интерпретации полученных результатов и может быть полезно студентам других биологических, медицинских и биотехнологических направлений, преподавателям и специалистам, чья профессиональная деятельность связана с дрожжами *Saccharomyces cerevisiae*.

Глава 1. Морфология дрожжей

Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* последние десятилетия рассматриваются как универсальный эукариотический микроорганизм для изучения основных функций, процессов размножения, транспорта веществ, передачи и хранения наследственной информации, то есть многих процессов и механизмов, лежащих в основе метаболизма всех эукариотических клеток.

Морфология дрожжей (от греч. «морфо» - форма) - одна из интересных и важных особенностей этого микроорганизма, так как оказывает непосредственное влияние на взаимодействие клетки с окружающей средой и, зачастую, является следствием такого взаимодействия.

В первой части данной главы клеточная морфология дрожжей рассматривается в контексте особенностей процессов размножения и возможных морфогенных переходов, вызванных особенностями условий культивирования или составом питательной среды.

Далее речь пойдет о морфологии субклеточных структур дрожжевой клетки, так называемых органелл или компартментов. Рассмотрение строения, функций, биогенеза или механизмов наследования основных органелл дрожжевой клетки помогает лучше понять биохимические превращения и особенности метаболизма дрожжей.

В зависимости от происхождения органеллы можно разделить на 2 группы. Первая группа - автономные органеллы, такие как эндоплазматический ретикулум, ядро, митохондрии. Как правило, эти органеллы наследуются в ходе реализации клеточного цикла от материнской клетки дочерней и не могут быть синтезированы «*de novo*». Вторая группа включает органеллы, которые происходят от компартментов первой группы, например, эндосомы, вакуоли, секреторные пузырьки, поэтому наравне с возможным наследованием от материнской клетки эти органеллы могут синтезироваться в дочерней клетке «*de novo*».

Дрожжевая клетка содержит включения. Понятием «включения» обозначают непостоянные структуры, которые, в отличие от органелл, то возникают, то исчезают в процессе жизнедеятельности клеток. Включения являются продуктами обмена дрожжевых клеток и отражают различные стороны и этапы физиологической активности клетки. Этими непостоянными структурами обычно являются внутриклеточные запасные соединения. К ним относятся липиды, гликоген и полифосфаты разной степени полимерности.

В большинстве случаев ультраструктурные особенности дрожжевой клетки соотносят со стадией клеточного цикла. *Клеточный цикл* представляет собой упорядоченную последовательность физиологических стадий, в результате которых из материнской клетки образуется дочерняя клетка. У дрожжей клеточный цикл принято делить на четыре основных стадии:

– **G1** (предсинтетическая) — период роста клетки и подготовки к размножению; в это время происходит синтез необходимых соединений, а также локальное ремоделирование клеточной стенки на участке будущего образования почки;

- **S** (синтетическая) — стадия, в ходе которой осуществляется репликация ДНК;
- **G2** (постсинтетическая) — период подготовки к митозу, в течение которого почка продолжает увеличиваться в размере;
- **M** — митоз, завершающийся цитокинезом — отделением дочерней клетки от материнской.

1.1 Морфотипы дрожжей

Дрожжи - эукариотические микроорганизмы, представители царства грибов. Рост и развитие дрожжей как одноклеточного микроорганизма являются теми основными критериями, которые выделяют таксономически разнообразные грибы в группу «дрожжи». При этом особенности происхождения и метаболизма дрожжей сохраняют за этой группой уникальные механизмы адаптации и стрессоустойчивости, которые в ряде случаев приводят к изменению исходной морфологии клеток [1,2]. Поэтому с точки зрения клеточной морфологии дрожжи могут быть представлены нижеперечисленными морфотипами (рис.1).

1. *Отдельные вегетативные клетки.* Собственно, речь идет о классической дрожжевой форме. При этом не имеет значения, размножается ли данный вид дрожжей почкованием как, например, *Saccharomyces cerevisiae*, или делением, как *Shizosaccharomyces pombe*. Определяющим фактором формирования отдельных вегетативных клеток является способность полного отделения почки от материнской клетки в конце клеточного цикла. Вегетативные клетки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, как правило, имеют сферическую или эллипсоидную форму. Такая форма при росте на жидких питательных средах является энергетически более выгодной, обеспечивая оптимальное соотношение площади поверхности и объема клетки. Это, в свою очередь, непосредственно связано с процессами массообмена с окружающей средой, протекающими через поверхность клетки.

2. *Мицелий (синцитий).* Дрожжи практически утратили этот морфотип. Мицелий дрожжей может быть истинным или ложным. Истинный мицелий может быть представлен классическими септированными или несептированными гифами. Примерами служит мицелий *Ashbya gossypii*, *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans* и др. Способность к формированию псевдомицелия у промышленно используемых дрожжей описал более 100 лет назад Хансен (Hansen) [3]. Морфологически псевдомицелий – септированные разветвленные нити, состоящие из дрожжевых клеток, как правило, более удлиненной морфологии, полученные в результате неполного отделения почек от материнской клетки. В отличие от истинного мицелия, вегетативные дрожжевые клетки и клетки псевдомицелия размножаются почкованием. Псевдомицелиальные клетки способны инвазивно расти на субстратах, что может рассматриваться как дополнительный механизм поиска питательных веществ [4].

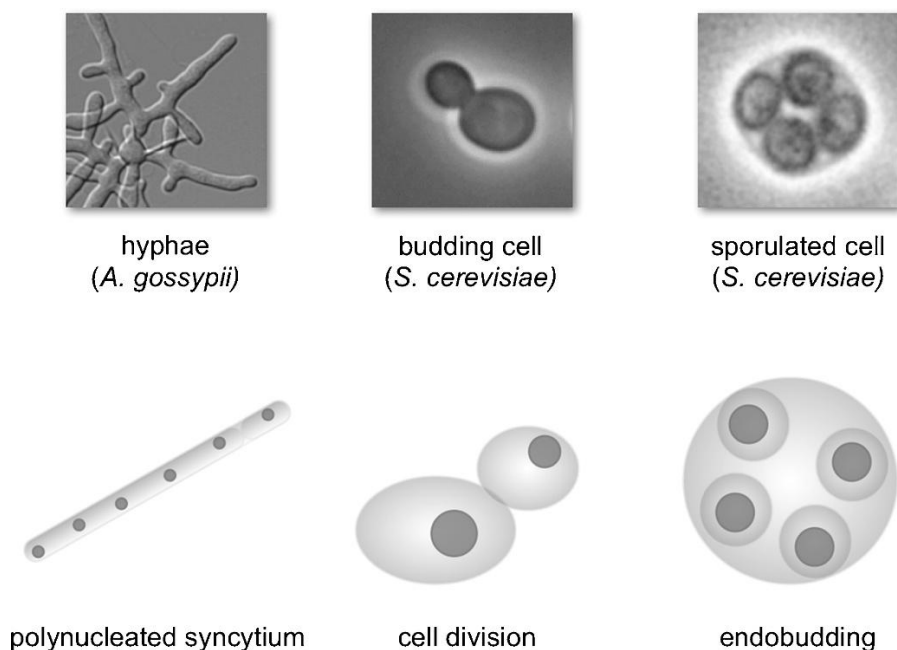


Рисунок 1 – Морфотипы дрожжей [1]¹

Псевдогифальный рост наблюдается у разных видов дрожжей: *Candida*, *Endomyces*, *Pichia* и др., включая дрожжи, применяемые в пивоварении, *Saccharomyces* и *Dekkera/ Brettanomyces*. Важно понимать, что способность к формированию псевдомицелия зависит не только от видовой принадлежности дрожжей, но и от условий их культивирования. Наиболее вероятными причинами формирования псевдомицелия считаются: недостаточность питательных веществ, культивирование при температурах, отличных от оптимальных, а также воздействие стрессовых факторов. При этом молекулярные механизмы формирования псевдомицелия до сих пор до конца не понятны.

3. *Спорулирующая клетка.* Такая форма визуализируется как отдельная структура и должна быть отнесена к самостоятельному морфотипу. Спорообразование дрожжей может быть рассмотрено как механизм выживания в условиях, непригодных для развития вегетативных и псевдогифальных форм. Известно, что в условиях недостатка источника углерода размножение дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* прекращается. При наличии в среде источников углерода, но в отсутствии источников азота дрожжи могут формировать псевдомицелий. В случае отсутствия источников углеродного и азотного питания дрожжи спорулируют. Спорогенная форма может развиваться из вегетативной или псевдогифальной форм. Образованию спор у *Saccharomyces cerevisiae* обычно предшествует мейоз. Таким образом, диплоидные дрожжи *S. cerevisiae* формируют 4 гаплоидных ядра. К концу

¹ Условные обозначения на рисунке: hyphae – гифы, budding cell – почкующаяся клетка, sporulated cell – спорулирующая клетка, polynucleated syncytium – многоядерный мицелий, cell division – размножающаяся клетка, endobudding – эндочкование, *A. gossypii* и *S. cerevisiae* -примеры видов дрожжей

мейоза присутствующие в цитоплазме гаплоидные ядра отделяются, что приводит к формированию тетрад у *S. cerevisiae* [1,5].

Морфология рассматривает не только внешнее, но и внутреннее строение дрожжевой клетки - организацию субклеточных структур клетки, так называемых органелл или компартментов. Внутриклеточное пространство клетки - гелеобразное содержимое, состоящее из воды и растворенных в ней белков, ионов и молекул, - носит название *цитозоль*. Цитозоль с размещенными в ней органеллами принято называть *цитоплазмой* клеток.

Контрольные вопросы

1. Перечислите основные морфотипы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и кратко охарактеризуйте условия, при которых формируется каждый из них.
2. Чем отличается истинный мицелий от псевдомицелия с точки зрения морфологии и способа размножения клеток?
3. Сколько гаплоидных ядер формируется в результате мейоза у диплоидного штамма *S. cerevisiae*?
4. Почему сферическая или эллипсоидная форма вегетативных клеток считается энергетически выгодной для роста в жидкой среде?

1.2 Клеточная стенка

Клеточная стенка дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* - компартмент клетки, который видим в световой микроскоп даже при увеличении в 100 раз. Поддержание формы клеток - одна из основных функций клеточной стенки. Благодаря особенностям строения и состава клеточной стенки дрожжи в зависимости от условий культивирования могут расти в виде овальных клеток либо удлинённых псевдомицелиальных форм, могут участвовать в процессе споруляции или слияния спор, в процессах формирования почки.

Другой важной функцией клеточной стенки дрожжей является защита от внешних воздействий. В первую очередь речь идет об осмотической устойчивости клетки. Осмолярность внутриклеточной среды часто выше, чем за пределами клетки. Особенности клеточной стенки дрожжей позволяют сдерживать поток воды, предотвращая чрезмерное набухание и возможную гибель клетки. Сочетание механической прочности и эластичности позволяет клеточной стенке обеспечивать не только осмоустойчивость клетки, но и защищает ее от механических повреждений. Кроме того, клеточная стенка демонстрирует уникальные способности к адаптации и благодаря динамическим изменениям своего состава приобретает нужные клетке свойства - например, способность флокулировать, формировать биопленку, укреплять её структуру и восполнять повреждения [6,7].

На клеточную стенку дрожжей приходится 10-30 % сухой массы вегетативной клетки *Saccharomyces cerevisiae* [6,8]. Согласно данным электронно-микроскопического анализа, ширина клеточной стенки составляет от 70 до 200 нм [9,10].

Основными компонентами клеточной стенки дрожжей являются β 1,3- и β 1,6 - связанные глюканы, маннопротеины и хитин (рис.2).

Внешняя сторона клеточной стенки имеет щеткообразную поверхность (рис.3). Этот слой состоит из сильно гликозилированных маннопротеинов [8, 11, 12]. Манноза в маннопротеинах может иметь α 1,6-, α 1,2- и α 1,3-ответвления. Фактическое содержание белка в маннопротеинах составляет всего около 5% от содержания сухих веществ клеточной стенки. Основная же масса приходится на боковые цепи углеводов, содержащих маннозу.

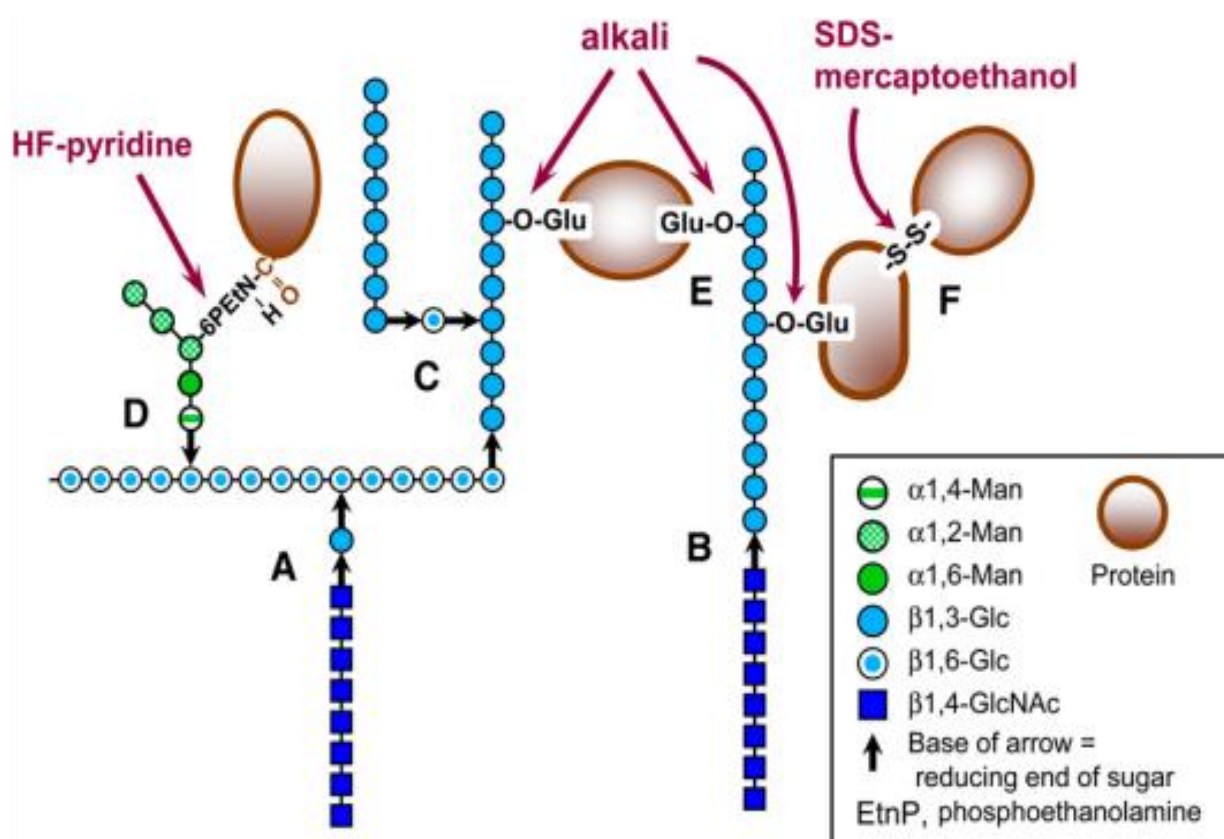


Рисунок 2 – Компоненты клеточной стенки дрожжей и возможные связи между ними [8]²

² Условные обозначения на рисунке: Alkali – щелочь; HF-pyridine – HF-пиридин; SDS-mercaptoethanol – SDS-меркаптоэтанол; protein – белок; Base of arrow = reducing end of sugar
Основание стрелки = восстанавливающий конец углевода

EtnP, phosphoethanolamine - фосфоэтанолламин

α 1,4-Man – α 1,4-маннан

α 1,2-Man – α 1,2-маннан

α 1,6-Man – α 1,6-маннан

β 1,3-Glc – β 1,3-глюкан

β 1,6-Glc – β 1,6-глюкан

β 1,4 – GlcNAc - β 1,4-N-ацетилглюкозамин (хитин)

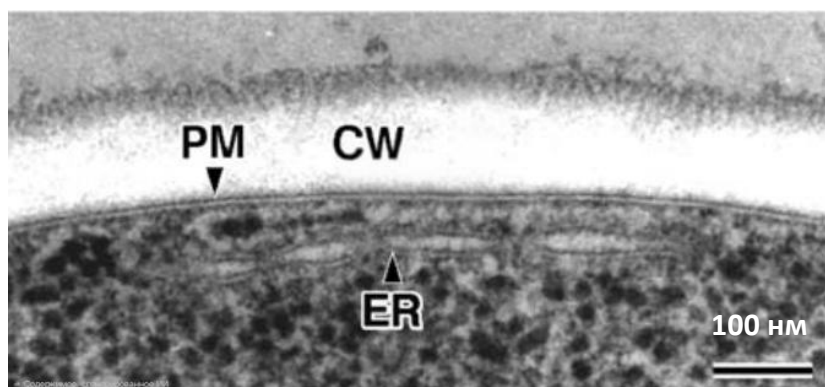


Рисунок 3 – Электронная фотография клеточной стенки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* [12]³

Функции маннопротеинов в клетке дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* довольно обширны. Эти макромолекулы обладают ферментативной активностью, играют структурную роль, участвуют в процессах межклеточного распознавания, ограничивают доступ чужеродным веществам и ферментам к внутренней части клеточной стенки и цитоплазматической мембране и в целом отвечают за все виды внешних взаимодействий клетки с окружающей средой. Маннопротеины, а точнее, фосфодиэфирные мостики их углеводных боковых цепей, отвечают за формирование отрицательного заряда клеточной поверхности.

Кроме того, углеводные составляющие маннопротеинов отвечают за гидрофильные свойства клеточной стенки и удержание молекул воды клеточной поверхностью.

Маннопротеины ковалентно связаны с внутренней сетью глюканов через фрагмент β 1,6-глюкана (рис.2) или напрямую с β 1,3-глюканом [11]. β -глюканы клеточной стенки дрожжей *S. cerevisiae* составляют 30-60% от сухого веса клеточной стенки [8]. β 1,3- и β 1,6-глюканы внутреннего слоя клеточной стенки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* формируют основной каркас клетки, отвечают за ее механическую прочность. С другой стороны, клеточная стенка дрожжей обладает высокой эластичностью, что также обусловлено свойствами данного полисахарида. Цепи β 1,3-глюкана по форме напоминают пружину [11]. Такая структура позволяет им существовать в различной степени растяжения. При внесении дрожжей в гипертонические растворы клеточная стенка дрожжей сжимается и может терять до 60% своего изначального объема. Этот процесс обратим при внесении клетки в благоприятную по осмотическому давлению питательную среду [6,12].

В стационарной стадии роста β 1,3-глюкановые цепи умеренно разветвлены, содержат около 1500 мономеров глюкозы и 4 процента β 1,6-связанных остатков глюкозы. Цепи β 1,6-глюкана в зрелой клетке (в стационарной стадии роста культуры) содержат примерно 140 мономеров

³ Условные обозначения на рисунке: PM – плазматическая мембрана; CW – клеточная стенка; ER – эндоплазматический ретикулум

глюкозы. В зависимости от распределения связей β -глюканы дрожжей *S. cerevisiae* могут быть разделены на 3 фракции:

1. основная фракция (примерно 35% от сухого веса клеточной стенки) – нерастворимый в щелочи и кислотах β -глюкан, подобное свойство обусловлено наличием связей с хитином [8,13];
2. вторая фракция (около 20% от сухого веса клеточной стенки) – растворимый в щелочи β -глюкан, растворимость обусловлена отсутствием связей с хитином [8];
3. третья фракция (примерно 5% от сухого веса клеточной стенки) – растворимый в кислотах, но нерастворимый в щелочах β -глюкан [8,14].

Третий важный компонент клеточной стенки – хитин. Хитин представляет собой полимер β 1,4-связанного N-ацетилглюкозамина. В обычных условиях, в отсутствии стресса, у дрожжевой клетки хитин является самым немногочисленным структурным элементом, на его долю приходится около 2% от сухого веса клеточной стенки [8].

Большая часть хитина локализуется в рубцах материнской и дочерней клеток. В клеточной стенке хитин обнаруживается в трех формах: в свободном виде, связанный с β 1,3-глюканом (в шейке между материнской и дочерней клетками), а также связанный с β 1,6-глюканом, ковалентно связанным с β 1,3-глюканом и маннаном [8,15]. Содержание хитина в мутантах *S. cerevisiae*, подвергнутых стрессу, может достигать 20% от веса клеточной стенки [8,16,17].

Динамика клеточной стенки. Количество и соотношение компонентов клеточной стенки, включая состав её белков, их локализация, варьируют в зависимости от стадии клеточного цикла, фазы роста культуры, условий культивирования (pH, T °C, O₂, доступность питательных веществ), наличия стрессовых воздействий на клетку [11,18]. В первую очередь динамика клеточной стенки, несомненно, тесно связана с ходом клеточного цикла. Так, например, хитин может быть распределен в разных областях клеточной стенки в зависимости от текущей стадии размножения клетки. Хитин локализуется в месте наклевывания почки, формирует первичную перегородку между материнской и дочерними клетками, а также может быть распределен в клеточной стенке дочерней клетки после цитокинеза, стабилизируя таким образом стенку будущей материнской клетки (рис.4) [8,19].

Дрожжи *S. cerevisiae* обладают 3 видами хитинсинтазы: CSI, CSII, CSIII. Белки-кофакторы, входящие в их состав, синтезируются в шероховатом эндоплазматическом ретикулуме, после чего транспортируются и активируются с помощью различных вспомогательных белков к месту синтеза хитина, в плазматическую мембрану. На поздней стадии G1 клеточного цикла, когда клетка готовится к размножению, выбирается участок клеточной стенки для формирования новой почки. Хитинсинтаза CSIII формирует хитиновое кольцо вокруг основания будущей почки (А на рис. 4, синий цвет). Это хитиновое кольцо закреплено в дрожжевой клеточной стенке путем присоединения хитина к β 1,3-глюкану [6]. Клеточная стенка в этом месте

ослабевает, и появляется почка, которая изначально растет апикально (речь идет про однонаправленный, «верхушечный», рост), но по мере увеличения почки изотропный (равномерный по всем направлениям) рост начинает преобладать, и почка приобретает округлую форму.

По завершении митоза между дочерней и материнской клетками путём центростремительного синтеза хитина (от хитинового кольца к центру) с помощью хитинсинтазы CSII образуется первичная перегородка (B на рис.4, красный цвет). Синтезируемый таким образом хитин первичной перегородки не связан с другими полимерами клеточной стенки. Первичная перегородка разделяет цитоплазматическую мембрану дочерней и материнской клеток, осуществляя цитокинез [8]. После этого в каждой клетке формируются вторичные перегородки, образуя трехслойную структуру (C на рис. 4, зеленый цвет).

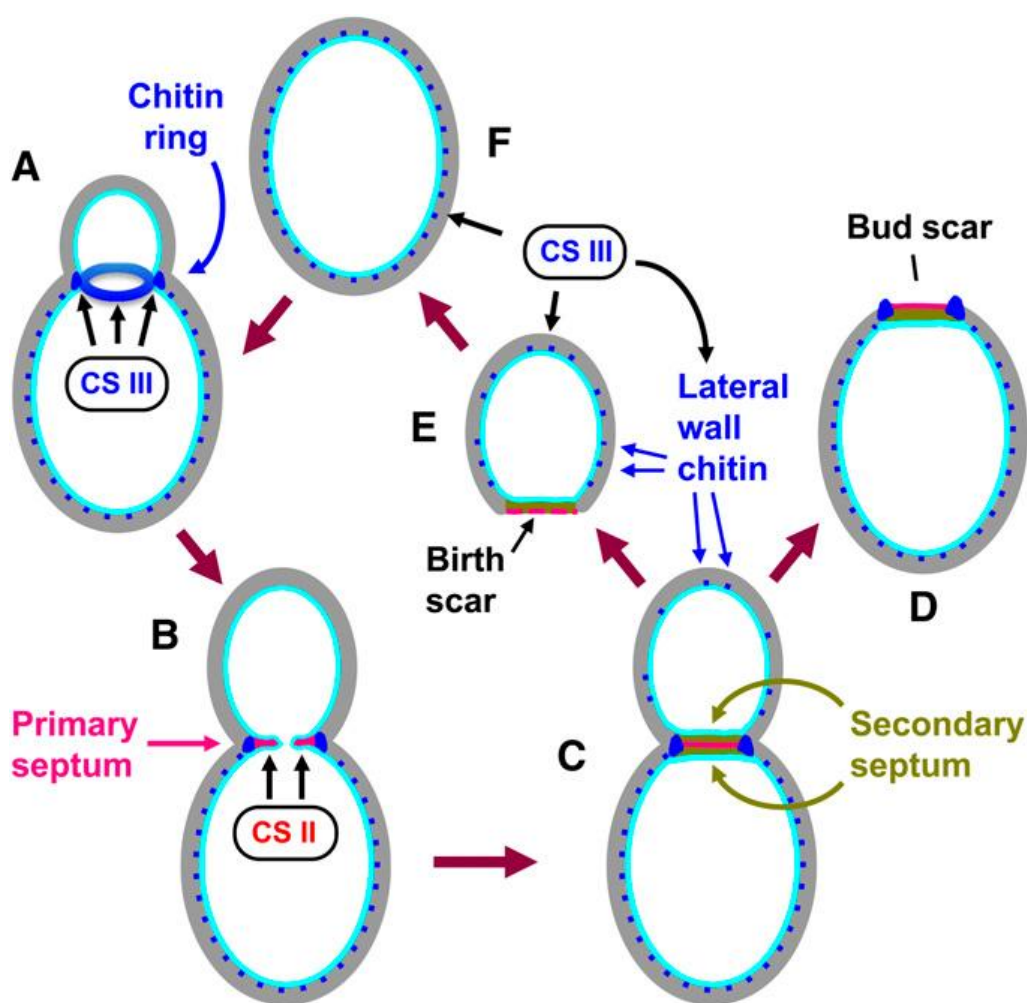


Рисунок 4 – Распределение хитина в клетке *Saccharomyces cerevisiae* в процессе размножения [8]⁴

⁴ Условные обозначения на рисунке: Chitin ring – хитиновое кольцо; Primary septum – первичная перегородка; Secondary septum – вторичная перегородка; Bud scar – родовой рубец дочерней клетки; Birth scar – родовой рубец материнской клетки; Lateral wall chitin – хитин клеточной стенки; CSII, CSIII – хитинсинтазы II и III

На следующем этапе хитинсинтаза CSIII начинает синтез хитина в клеточной стенке дочерней клетки. Выработка дочерней клеткой фермента хитиназы растворяет первичную перегородку, что облегчает разделение клеток и высвобождает дочернюю клетку (D на рис. 4). Именно работой хитиназы объясняется тот факт, что родовой рубец на дочерней клетке гораздо менее заметен, чем рубец на материнской клетке (F и E на рис. 4).

Синтез хитина в дочерней клетке продолжается после цитокинеза, благодаря работе хитинсинтазы CSI, до тех пор, пока новая клетка не достигнет размера материнской и не вступит в следующий клеточный цикл для почкования [6,8].

Не только специфические хитинсинтазы дрожжей *S. cerevisiae*, но и более 50% всех белков клеточной стенки регулируется клеточным циклом. [6,11].

За последние десятилетия накоплено огромное количество данных об особенностях строения, биосинтеза и динамики клеточной стенки дрожжей *S. cerevisiae* в различных условиях. Так, например, показано, что клеточная стенка дрожжей в стационарной стадии роста становится более устойчивой к внешним воздействиям, менее проницаемой для макромолекул по сравнению с клетками, находящимися в экспоненциальной стадии роста. Это объясняется, в том числе, увеличением толщины клеточной стенки, возрастанием числа дисульфидных мостиков (в 6-7 раз) и повышением уровня фосфорилирования белков [11, 20-22].

Различные стрессовые воздействия (температурный стресс, гиперосмотический, стресс от недостатка питательных веществ, переход к анаэробным условиям культивирования и проч.), а также локальные повреждения, запускающие процессы восстановления клеточной стенки, влекут за собой специфические изменения в составе и свойствах данной клеточной структуры. Определенно ясно, что синтез клеточной стенки является очень динамичным процессом. Клетка постоянно адаптирует организацию данного компартмента к изменяющимся условиям среды. Регуляция этих процессов продолжает изучаться и представляет несомненный практический интерес.

Контрольные вопросы

1. Назовите три основных структурных компонента клеточной стенки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и укажите их основные функции.
2. Как изменяется содержание и распределение хитина в клеточной стенке в зависимости от стадии клеточного цикла?
3. Объясните, почему клеточная стенка дрожжей сохраняет механическую прочность и одновременно обладает высокой эластичностью.
4. Какие полисахариды отвечают за гидрофильные свойства клеточной стенки?

1.3 Цитоплазматическая мембрана

Цитоплазматическая мембрана (далее – ЦПМ) дрожжей *S. cerevisiae* входит наравне с клеточной стенкой в состав так называемой клеточной оболочки. ЦПМ отделяет внутреннее содержимое клетки от внешней среды, обеспечивает механическую поддержку, отвечает за селективный транспорт, установление клеточной полярности и межклеточное взаимодействие [23,24].

Плазматическая мембрана дрожжей, как и мембраны бактерий и прочих эукариотических клеток, представляет собой бислой, образованный полярными молекулами фосфолипидов и белками. Качественный и количественный состав плазматической мембраны оказывают непосредственное влияние на её физико-химические свойства и зависят от штамма дрожжей и условий культивирования.

Липиды составляют примерно 50% от состава мембраны. Липиды дрожжей *S. cerevisiae* представлены следующими классами веществ: глицерофосфолипиды (около 70% от всех липидов), сфинголипиды (около 15%) и стерины (около 15%) [23]. Глицерофосфолипиды имеют в своей основе глицериновую основу, соединенную с двумя остатками жирных кислот, и могут быть разделены в соответствии с составом их гидрофильных головок: H, инозитол, серин, этаноламин и холин (красные элементы на рис. 5).

На рис. 5 показаны структуры фосфолипида PA (фосфотидная кислота) и основных фосфолипидов дрожжей *S. cerevisiae* PI, PS, PE и PC (фосфотидилинозитол, фосфотидилсерин, фосфотидилэтанолламин, фосфотидилхолин соответственно), которые являются производными от PA.

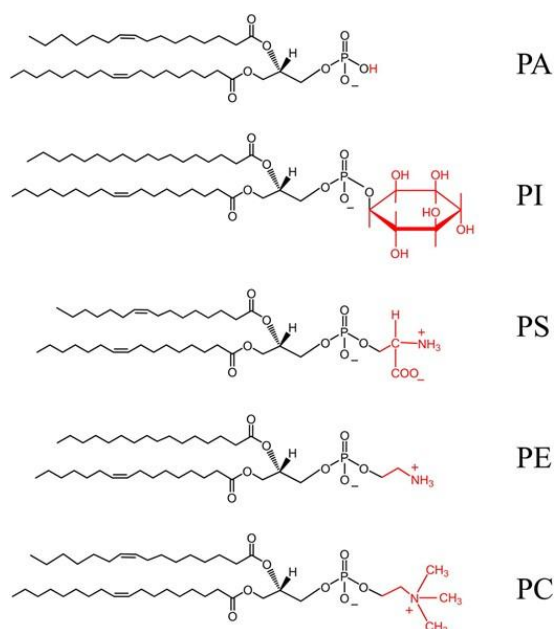


Рисунок 5 – Фосфолипидные структуры плазматической мембраны *S. cerevisiae* [26]⁵

⁵ Условные обозначения на рисунке: PA - фосфотидная кислота; PI – фосфотидилинозитол; PS – фосфотидилсерин; PE - фосфотидилэтанолламин; PC - фосфотидилхолин соответственно.

Четырьмя наиболее распространенными жирными кислотами, этерифицированными до глицерин-3-фосфатной основы фосфолипидов, являются пальмитиновая, пальмитолеиновая, стеариновая и олеиновая кислоты. Относительные количества фосфолипидов в плазматической мембране, а также их качественный состав варьируются в зависимости от штамма и условий культивирования [23-26].

Сфинголипиды плазматической мембраны дрожжей (рис. 6) содержат в своем составе две длинные углеводородные цепи, одна из которых – остаток жирной кислоты, другая – остаток сфингозина. Кроме того, в молекуле сфинголипидов присутствует остаток фосфорной кислоты. В зависимости от состава головной группы сфинголипиды плазматической мембраны дрожжей *S. cerevisiae* делятся на:

- инозитол фосфорилцерамид (IPC);
- маннозил-инозитол фосфорилцерамид (MIPC);
- маннозил-диинозитол фосфорилцерамид (MIP₂C).

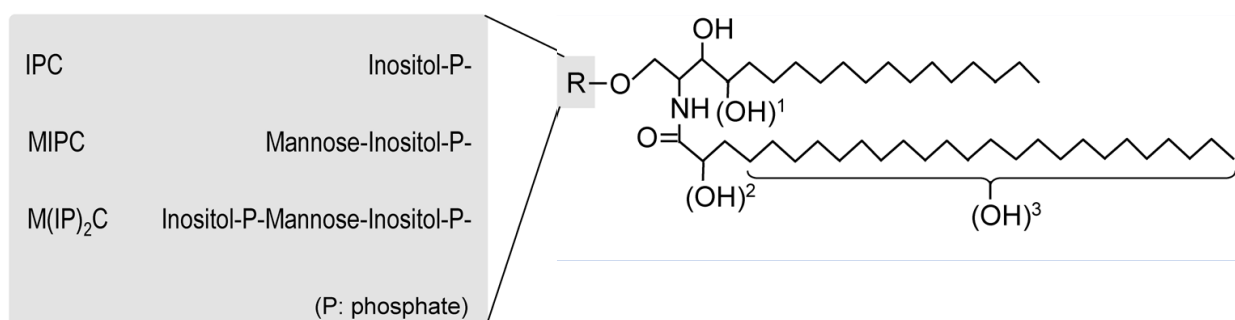


Рисунок 6 – Структура сфинголипидов плазматической мембраны *S. cerevisiae* [27]⁶

Особенности упаковки сфинголипидов, обусловленные наличием насыщенных ацильных цепей, увеличивают толщину цитоплазматической мембраны и повышают ее жесткость.

Третий класс липидов, присутствующих в плазматической мембране *S. cerevisiae*, стерины. Стерины повышают жесткость мембраны, обеспечивая более плотную упаковку липидов. Основной стерол дрожжей, эргостерол (рис. 7), содержит гидроксильную группу, алкенильную боковую цепь и ядро с четырьмя ароматическими кольцами [23,28,29].

Другим не менее важным компонентом плазматической мембраны дрожжей являются белки, на долю которых приходится около 40% от массы мембраны. Виды белков, их количество меняется в зависимости от условий. Показано, что активность и стабильность белков мембраны зависят от липидов, которые их окружают [23,30].

⁶ Условные обозначения на рисунке: IPC - инозитол фосфорилцерамид; MIPC - маннозил-инозитол фосфорилцерамид; M(IP)₂C - маннозил-диинозитол фосфорилцерамид; P -фосфатная группа.

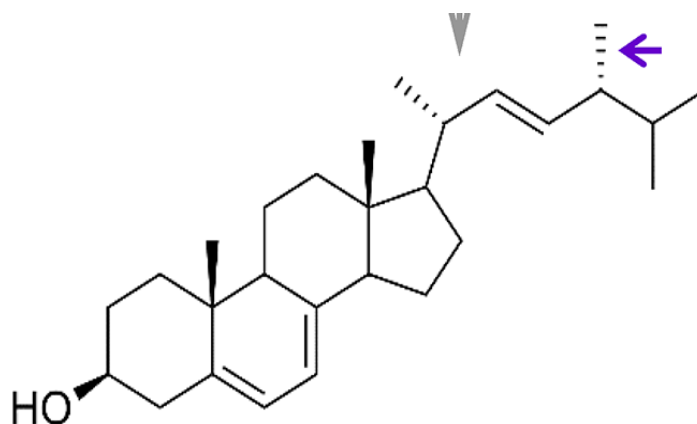


Рисунок 7 – Структура эргостерола [29]

Зачастую мембранным белкам липиды нужны в виде кофакторов или в качестве структурных компонентов для формирования правильной белковой конформации и стабильности. Именно соотношение липидов и белков в мембране, их качественный и количественный состав влияют на физико-химические свойства цитоплазматической мембраны, на её толщину, вязкость, проницаемость, натяжение.

Большинство белков плазматической мембраны выполняет транспортные функции, остальные участвуют в биосинтезе клеточной стенки, передаче сигнала, формировании цитоскелета.

ЦПМ выполняет множество различных функций, в осуществлении которых задействованы различные белки и белково-липидные комплексы. В зависимости от качественного и количественного состава белков и липидов, пространственной организации, размера, механизма образования и выполняемых функций, участки ЦПМ принято делить на специализированные домены. На рис. 8 схематично представлено распределение известных доменов разных типов на поверхности ЦПМ и на поперечном срезе *S. cerevisiae* [24,31]. Кратко остановимся на описанных на сегодняшний день доменах и их функциях.

Домены MCL локализованы в местах контакта ЦПМ и ЭПР, содержат белки-переносчики липидов (Ltc/Lam) и отвечают за перенос стеролов.

Домены MCR содержат сфинголипиды и самые распространенные белки ЦПМ, Pma1 и Pm1. Домены MCR участвуют в формировании протонного градиента и откачки протонов из клетки.

Домены MCC могут быть представлены локальными пятнами, инвагинациями, похожими на борозды. Их количество и глубина увеличиваются в стационарной стадии роста. Домены MCC известны как место сборки клеточной стенки, отвечают за регуляцию биосинтеза липидов и реализацию защиты белков-транспортёров от эндоцитоза.

Дополнительные домены MST и MCW – динамические структуры на основе белков и белковых комплексов. Отвечают за передачу сигналов (MST) и определение напряжения клеточной стенки (MCW).

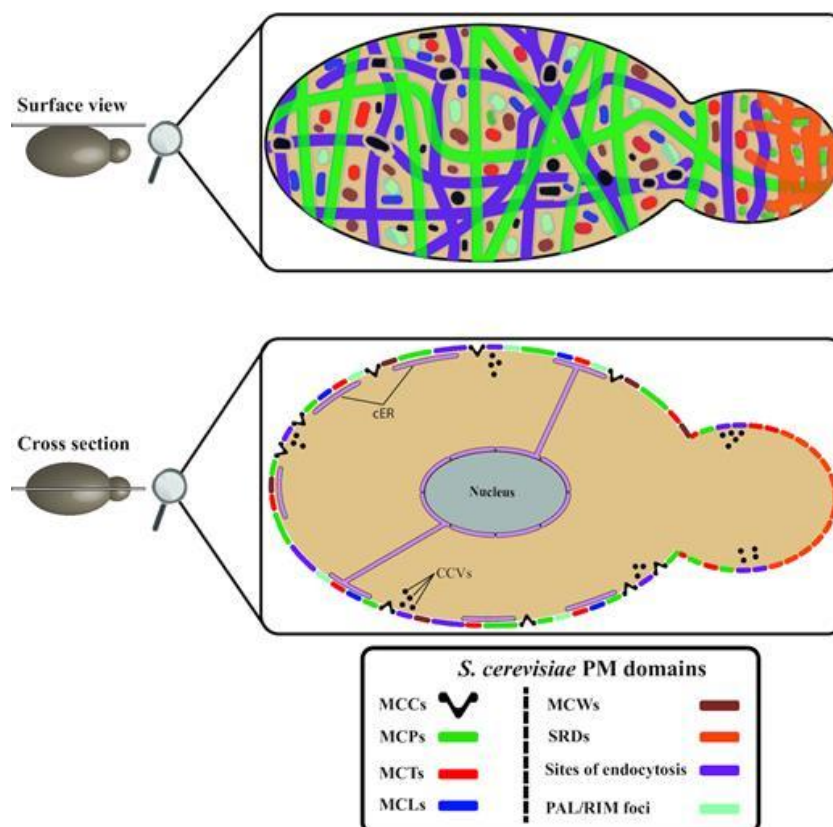


Рисунок 8 – Схематичное представление доменов в цитоплазматической мембране *Saccharomyces cerevisiae* [24]⁷

Отдельно рассматриваются динамические домены эндоцитоза, которые в большем количестве представлены именно в почках. На данных участках образуются везикулы, покрытые клатрином.

Поляризованные домены SRD в основном представлены стеринами и сфинголипидами, локализованы в полярных областях роста клеток.

Домены-очаги PAL/RIM имеют самые маленькие размеры, отвечают за определение внешнего уровня pH и липидной асимметрии.

Динамика ЦПМ. Учитывая ключевую роль ЦПМ в процессах транспорта питательных веществ, метаболизме клетки и поддержании её гомеостаза, очевидно существенное значение динамики и рециркуляции плазматической мембраны.

Динамика ЦПМ осуществляется посредством работы эндосомальной системы, где с одной стороны задействованы пути ретроградной транспортировки (транспорт питательных веществ от эндосомы⁸ к аппарату

⁷ Условные обозначения на рисунке: Surface view – вид поверхности; Cross section – поперечное сечение; *S. cerevisiae* PM domains – домены цитоплазматической мембраны *S. cerevisiae*; MCCs, MCPs, MCTs, MCLs, MCWs, SRDs – обозначения доменов, Sites of endocytosis – сайты эндоцитоза; PAL/ RIM foci – домены PAL/ RIM

⁸ Эндосома - мембранная внутриклеточная органелла, образующаяся путем выпячивания ЦПМ – рисунок 9.

Гольджи), а с другой – пути рециркуляции ЦПМ, то есть возврат эндоцитозированных молекул к плазматической мембране (рис. 9).

Эндоцитозированные молекулы первоначально попадают в раннюю эндосому, где происходит первая сортировка «груза». По мере созревания и сортировки содержимого эндосома приобретает статус поздней эндосомы, так называемой «превакуоли», которая далее направляется на слияние с вакуолью.

Наиболее очевидный ретроградный путь доставки молекул реализуется путем транспорта эндосомы ЦПМ в компартмент аппарата Гольджи – транс-сеть Гольджи (TGN – Trans-Golgi Network). Недавние данные свидетельствуют о том, что ретроградные пути могут происходить из вакуоли и даже из превакуоли (рис. 9). Эти процессы не только поставляют субстрат для работы аппарата Гольджи, но и позволяют регулировать состав мембран задействованных органелл.

Пути рециркуляции ЦПМ отвечают за возврат молекул к плазматической мембране, тем самым обеспечивая её гомеостаз. Рециркуляция ЦПМ может осуществляться секреторными путями от аппарата Гольджи, либо по прямому раннему пути рециркуляции эндосомы к плазматической мембране (рис.9) [31,32].

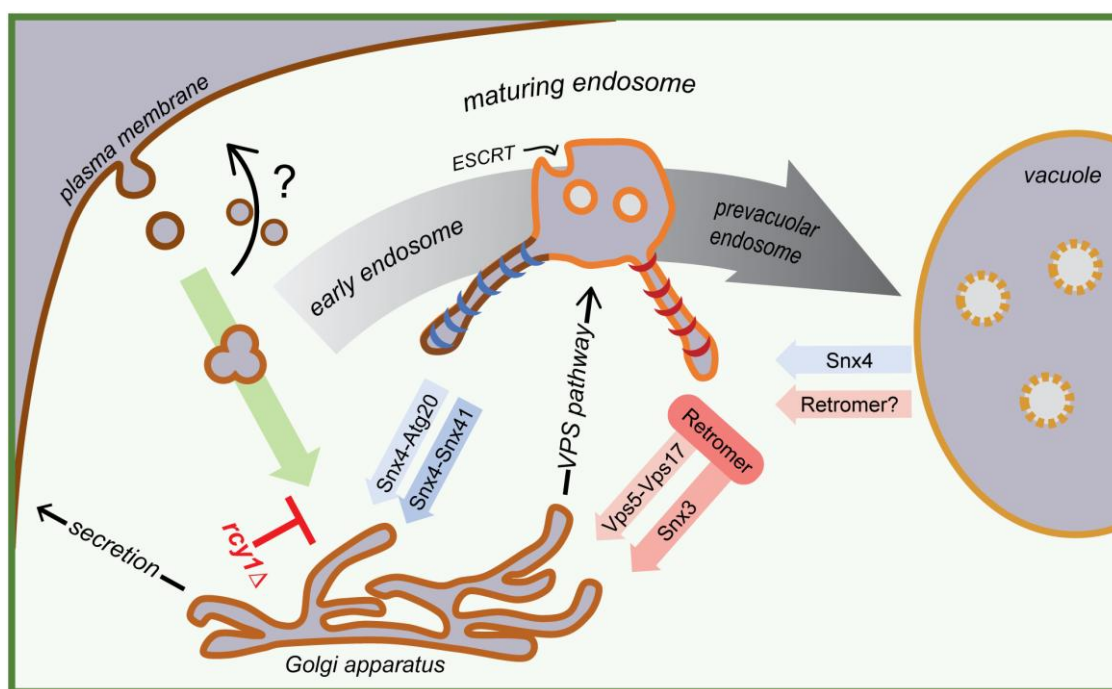


Рисунок 9 - Пути ретроградного транспорта и рециркуляции плазматической мембраны дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* [32]⁹

⁹ Условные обозначения на рисунке: plasma membrane – плазматическая мембрана; maturing endosome – созревающая эндосома; early endosome – ранняя эндосома; prevacuolar endosome – превакуоль; vacuole – вакуоль; retromer – ретромер; VPS pathway – VPS путь; secretion – секреция; Goldgi apparatus – аппарат Гольджи

Физиологическая роль описанных процессов и их взаимосвязь уточняются. На сегодняшний день очевидно, что рассматриваемые процессы не только отвечают за транспорт питательных веществ и утилизацию продуктов выведения, но и позволяют поддерживать гомеостаз мембран и их функции.

Контрольные вопросы

1. Перечислите три основных класса липидов, входящих в состав плазматической мембраны *S. cerevisiae*, и укажите их роль в поддержании структуры мембраны.
2. От чего зависит качественный и количественный состав фосфолипидов цитоплазматической мембраны?
3. Дайте определение специализированным доменам цитоплазматической мембраны. Опишите функции основных доменов.
4. Что такое ретроградный транспорт и рециркуляция плазматической мембраны? Какое значение эти процессы имеют для гомеостаза клетки?

1.4 Эндоплазматический ретикулум

Эндоплазматический ретикулум (ЭПР) выполняет в клетке дрожжей *S. cerevisiae* множество функций: перемещение белков (например, перемещение секреторных белков в аппарат Гольджи); интеграция белков в мембрану; модификация белков в полости ЭПР; синтез липидов (например, стеролов, фосфолипидов); хранение ионов кальция и регулируемое их высвобождение в цитоплазму клетки [33-35].

Эндоплазматический ретикулум - крупный мембранный компартмент клетки, расположенный в цитоплазме. По последним представлениям, ЭПР состоит из перинуклеарного ЭПР (ядерной оболочки) и периферического ЭПР. Компартмент представляет собой разветвленную сеть мембранных цистерн и канальцев (рис.10). Часть периферического эндоплазматического ретикулума, расположенного в непосредственной близости от плазматической мембраны, называют кортикальными ЭПР [35-37].

Отличительной особенностью ЭПР является то, что состоит он из мембранного бислоя и имеет один непрерывный просвет. Структура ЭПР содержит множество различных доменов - особых сайтов взаимодействия с плазматической мембраной, аппаратом Гольджи, митохондриями и другими органеллами [35,38,39]. Подобное взаимодействие, в свою очередь, может влиять на морфологию эндоплазматического ретикулума.

Интересно, что ядерная оболочка, несмотря на свою функциональную принадлежность к ядру, является частью ЭПР и представляет собой двойной мембранный бислой (рис.10).

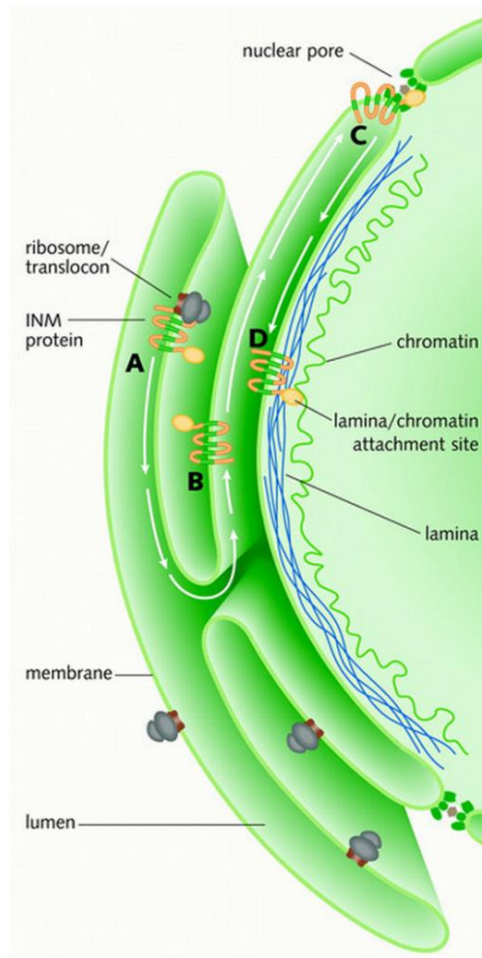


Рисунок 10 – Структура эндоплазматического ретикулаума дрожжей *S. cerevisiae* [33]¹⁰

Две стороны ядерной оболочки, внешняя и внутренняя мембраны, разделены межъядерным мембранным пространством (около 50 нм). Внешние и внутренние ядерные мембраны соединяются в ядерных порах, обеспечивая возможность диффузии молекул между ядерным и цитоплазматическим пространствами.

Периферический ЭПР берет начало от внешней ядерной мембраны, состоит из цистерн и канальцев, причем последние преобладают к периферии клетки. Установлено, что канальцевая морфология ЭПР в клетках дрожжей животных и растений регулируется интегральными белками семейства Rtn (Reticulon) и DP1/Yop1 [35,38-40]. В подтверждение показано, что в клетках дрожжей, из которых удалены Rtn/Yop1, отсутствуют канальцы, но имеются цистерны [40].

¹⁰ Условные обозначения на рисунке: Nuclear pore – ядерная пора, ribosome/ translocon – прикрепленная рибосома, INM protein – белок внутренней ядерной мембраны, membrane – мембрана, lumen – просвет, chromatin - хроматин, lamina/chromatin attachment site – центр связывания ламина/хроматин, lamina – ламина (фибрилярная сеть белков, расположенных под ядерной мембраной, A-B-C-D – путь белка внутренней ядерной мембраны от места синтеза в периферическом ЭПР (A), через ЭПР (B) и ядерную пору (C), к месту прикрепления на внутренней поверхности перинуклеарного ЭПР (D)

За стабилизацию цистернального ЭПР отвечают крупные белковые комплексы, в том числе полирибосомы. В зависимости от наличия или отсутствия рибосом на поверхности ЭПР принято различать гладкий и шероховатый ЭПР. При этом цистерны содержат больше рибосом, чем каналцы. Таким образом, шероховатый ЭПР отвечает за синтез секреторных и мембранных белков. Исходя из чего, можно предположить, что в гладком ЭПР происходит синтез липидов [35,36].

Динамика ЭПР. Эндоплазматический ретикулум относится к тем органеллам клетки, которые не могут быть синтезированы «de novo» в дочерней клетке, в связи с чем такие органеллы должны наследоваться от материнской клетки.

Интересно, что и кортикальный ретикулум, и ядерная оболочка остаются неповрежденными во время митоза (рис.11) [36,39,41].

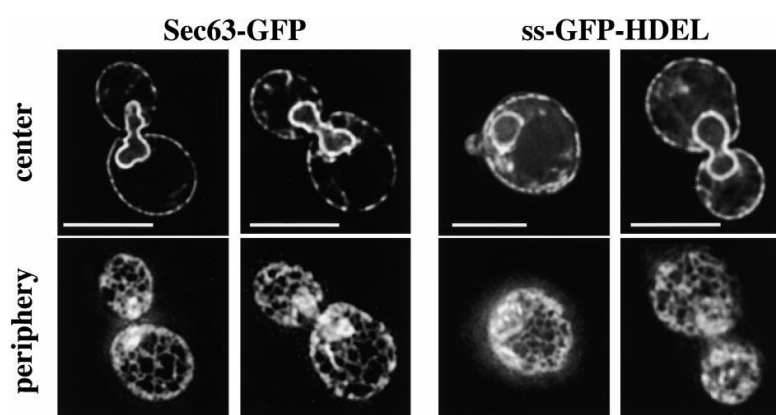


Рисунок 11 – Визуализация перинуклеарного и периферического ЭПР клеток почкующихся дрожжей с помощью флуоресцентной микроскопии, в шкале 5 мкм [41]¹¹

Разделение ядерной оболочки между материнской и дочерней клетками – последовательный многоступенчатый процесс, который включает миграцию ядра в шейку почки и последующее расширение его к концам материнской и дочерней клеток. Кортикальный ретикулум тоже наследуется упорядоченным образом. ЭПР в почке появляется уже во время S-стадии клеточного цикла, задолго до стадии миграции ядра в шейку.

Кортикальный ретикулум тоже наследуется упорядоченным образом. ЭПР в почке появляется уже во время S-стадии клеточного цикла, задолго до стадии миграции ядра в шейку. Процесс начинается с расширения эндоплазматических каналцев вдоль оси роста почки (рис. 12). Интересно, что апикальный кончик почки действует как место стыковки этих каналцев [36,39,41]. После такого закрепления каналцев на верхушке почки процесс продолжается распространением ЭПР по периферии растущих почек.

¹¹ Условные обозначения на рисунке: Center – центр, визуализация перинуклеарного ЭПР; Periphery – периферического ЭПР

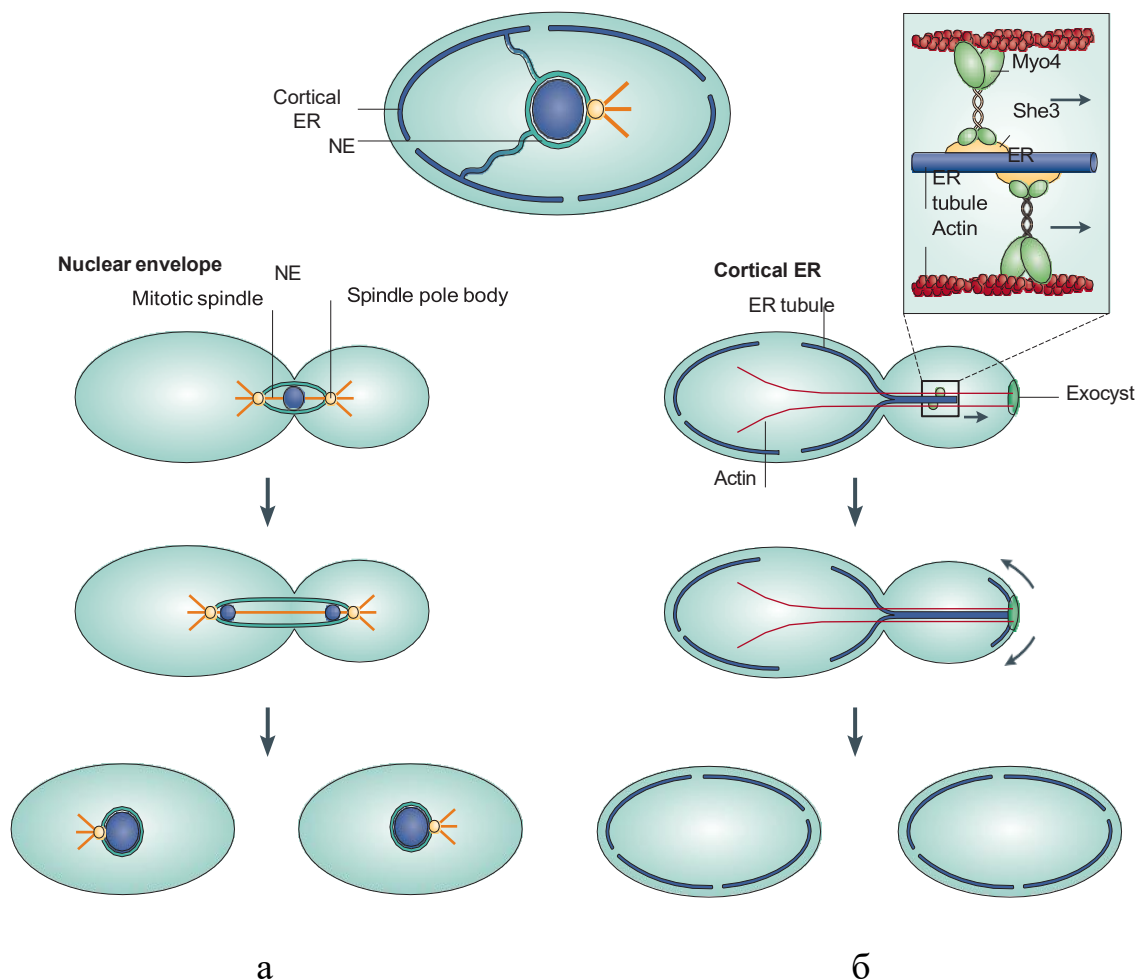


Рисунок 12 – Модель наследования перинуклеарного (а) и кортикального (б) ЭПР у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* [39]¹²

За направленное распространение ЭПР в почке отвечают актиновые нити [36,41]. Актиновые нити (актиновые микрофиламенты) - нити из глобулярного белка актина, присутствующие в цитоплазме эукариотических клеток. Нити актина обладают полярностью, то есть имеют неодинаковый состав и строение двух концов. Благодаря этому они могут принимать участие в направленном перемещении некоторых мембранных компартментов дрожжей.

Главным образом такие перемещения происходят при сегрегации органелл между материнской и дочерней клетками в процессе размножения. Актиновые направляющие способствуют транспорту в почку секреторных пузырьков, митохондриальных канальцев, вакуолей, сети ЭПР и зрелых

¹² Условные обозначения на рисунке: Cortical ER – кортикальный ЭПР, Nuclear envelope (NE) – ядерная оболочка (перинуклеарный ЭПР), Mitotic spindle – веретено деления, Spindle pole body – полюс веретена деления, Actin – актин, ER tubule – трубка ЭПР, Exocyst – апикальный кончик почки, Myo4 – моторный белок, She3 – белок прикрепления

компарментов Гольджи. При этом после формирования ЭПР в почке далее ретикулум может поддерживаться актиннезависимым механизмом [41-43].

Контрольные вопросы

1. Из каких основных частей состоит эндоплазматический ретикулум дрожжей *S. cerevisiae*?
2. Какие белки отвечают за формирование канальцевой морфологии ЭПР?
3. Чем различаются функции гладкого и шероховатого ЭПР в клетке дрожжей?
4. Опишите, как происходит наследование кортикального ЭПР в процессе почкования.
5. Какую роль играют актиновые нити в направленном распространении ЭПР в формирующуюся почку?

1.5 Ядро

Ядро – важнейшая органелла клетки, носитель генетической информации, место, где происходят экспрессия генов, процесс созревания и ядерный экспорт матричной РНК (мРНК) и рибосомальной РНК (рРНК), дублирование, репарация и сегрегация хромосом. А значит, от правильного функционирования ядра зависит не только передача наследственной информации и возможность реализации полноценного клеточного цикла, но и синтез всего протеома клетки, а значит, динамика и биосинтез всех её компарментов.

В качестве структурных элементов ядра принято рассматривать: ядрышко, ядерно-поровый комплекс и ядерную оболочку. Последняя по текущим представлениям является частью ЭПР клетки и была описана выше. Тем не менее, двойная ядерная оболочка не только отделяет хроматин и содержимое нуклеоплазмы от цитоплазмы, но и задействована в большинстве процессов, протекающих в ядре. Уникальные белковые компоненты внутренней ядерной мембраны (рис. 10) выступают сайтами связывания хроматина (неклеопротеида, состоящего из ДНК и белков), полюсом веретена деления, могут связывать рДНК (в данном случае рДНК – рибосомная ДНК, не путать с рекомбинантной ДНК), участвовать в репарации ДНК, в процессах транспорта макромолекул из ядра в цитоплазму [44,45].

Ядерно-поровый комплекс представляет собой структуры, содержащие 456 нуклеопоринов 30 различных типов [44,46]. Структура комплекса размещается на порах ядерной оболочку и напоминает пончик, симметричный относительно центрального канала, с гибкими белковыми нитями, отходящими в цитоплазму и в нуклеоплазму. Эти структуры выступают сайтами связывания для транспорта мРНК, хроматина, белков. Как видно, некоторые функции внутренней ядерной мембраны и ядерно-порового комплекса аналогичны, поэтому при потере любого из этих элементов белок второго может восполнять нужные функции.

Ядрышко у почкующихся дрожжей *S. cerevisiae* представляет собой структуру в виде полумесяца, занимающую примерно треть объема ядра, примыкающую к ядерной оболочке и лежащую напротив места локализации полюса веретена деления (SPB). Ядрышко не имеет оболочки и выявляется только как зона повышенной плотности, демонстрируя в области своей локализации большую разницу между его показателем преломления и показателем окружающей нуклеоплазмы при фазово-контрастной микроскопии [44,47,48].

В настоящее время известно, что, в дополнение к своей основной функции биосинтеза рибосом, ядрышко поддерживает выработку мРНК, тРНК (транспортная РНК, то есть РНК, обеспечивающая взаимодействие аминокислоты и матричной РНК), а также малых ядерных РНК: РНК частиц распознавания сигнала (SRP-RNA), РНК теломеразы, поддерживающей целостность хромосом (RNP-RNA) и РНК сплайсосомы (RNA U6) [48].

Динамика ядра у почкующихся дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Завершающей стадией клеточного цикла дрожжей является митоз. Митоз включает этапы сегрегации хромосом, деления ядер и цитокинеза. Стадии митотического деления ядра любой эукариотической клетки:

- профазы (происходит формирование хромосом);
- метафазы (хромосомы выстраиваются на экваторе, образуя веретено деления);
- анафазы (каждая хромосома разделяется на 2 идентичные хромосомы);
- телофазы (хромосомы раскручиваются, формируются ядерные оболочки).

В отличие от эукариотических клеток млекопитающих, ядерная оболочка дрожжей не разрушается во время митоза. У *S. cerevisiae* в ядерной оболочке присутствует особый домен, выступающий в роли полюса веретена деления (SPB – Spindle Pole Body – рис.12). По своим свойствам SPB аналогичен свойствам centrosom животных клеток. Во время стадии G1 клеточного цикла SPB дублируется, но при этом, на начальном этапе, локализованы эти два сайта очень близко, на расстоянии примерно 1,5 мкм [49], образуя тем самым короткое веретено деления из биполярных ядерных микротрубочек. Каждая хромосома дрожжей связывается с микротрубочкой с помощью кинетохор - белков прикрепления (рис. 13).

Прикрепление всех хромосом к веретену деления сигнализирует клетке о вступлении в анафазу митоза – стадию разделения хромосом. В ходе анафазы у дрожжей *S. cerevisiae* можно выделить несколько стадий.

В анафазе А хромосомы разделяются и мигрируют к полюсам. Из-за малого размера микротрубочек веретена деления расхождение хромосом на этом этапе не значительно.

В анафазе Б происходит основное разделение хромосом, так как на этом этапе происходит расхождение полюсов SPB, удлинение веретена деления до тех пор, пока оно не достигнет конечной своей длины. На этом этапе веретено располагается параллельно оси материнской клетки (рис. 13).

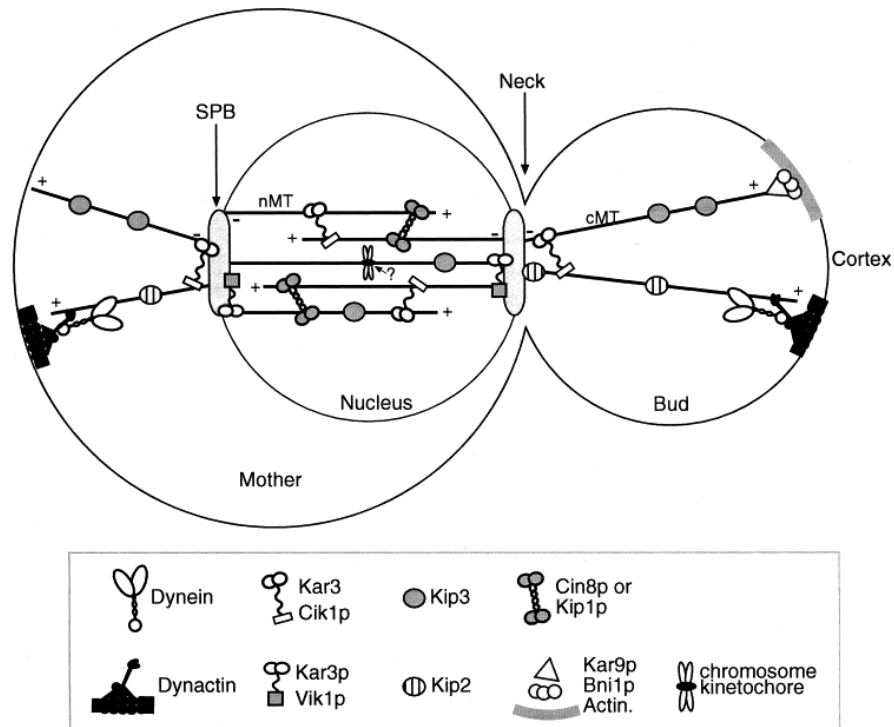


Рисунок 13 – Схематичное изображение расположения веретена деления в ядре дрожжей *S. cerevisiae* в анафазе митоза [49]¹³

Правильное позиционирование веретена осуществляется цитоплазматическими микротрубочками, которые соединяют SPB, с одной стороны, с полюсом растущей почки и противоположным полюсом материнской клетки, с другой. По мере удлинения веретена один его полюс втягивается через шейку в почку, в то время как другой полюс остается в материнской клетке. В телофазе митоза веретено разбирается, и за этим следует цитокинез [49,50].

Контрольные вопросы

1. Перечислите и охарактеризуйте основные структурные элементы ядра дрожжей *S. cerevisiae*.
2. В чем особенность митотического деления ядра у дрожжей *S. cerevisiae* по сравнению с клетками млекопитающих?
3. Что такое полюс веретена деления (SPB) и какую роль он выполняет в расхождении хромосом у *S. cerevisiae*?
4. Опишите строение и функции ядрышка. Какие типы РНК в нем содержатся?

¹³ Условные обозначения на рисунке: Mother – материнская клетка; Bud – почка; Nucleus – ядро; Neck – перегородка; SPB (Spindle Pole Body) - полюс веретена деления; Chromosome kinetochores – кинетохора хромосом (белок прикрепления)

1.6 Аппарат Гольджи

Аппарат Гольджи – органелла, открытая в 1898 году итальянским цитологом, Камилло Гольджи, который описал его как некий пластинчатый комплекс. Аппарат Гольджи (АГ) признан одной из центральных органелл мембранного транспорта клетки, так как отвечает за транспорт, сортировку и модификацию белков. Поэтому понимание организации и функционирования аппарата Гольджи имеет фундаментальное значение.

Классическая модель строения АГ эукариотической клетки представлена упорядоченной стопкой мембранных цистерн. Однако с развитием новых технологий и подходов к исследованию микро- и наноструктур (электронная томография и микроскопия, микроскопия сверхразрешения, электронная конфокальная микроскопия, органеллярная протеомика) [51] данные о внутриклеточном строении дрожжей и их органелл постепенно уточняются. Как оказалось, привычная нам организация аппарата Гольджи в виде стопки мембранных цистерн может быть обнаружена у дрожжей *Pichia pastoris* и *Shizosaccharomyces pombe* (рис.14).

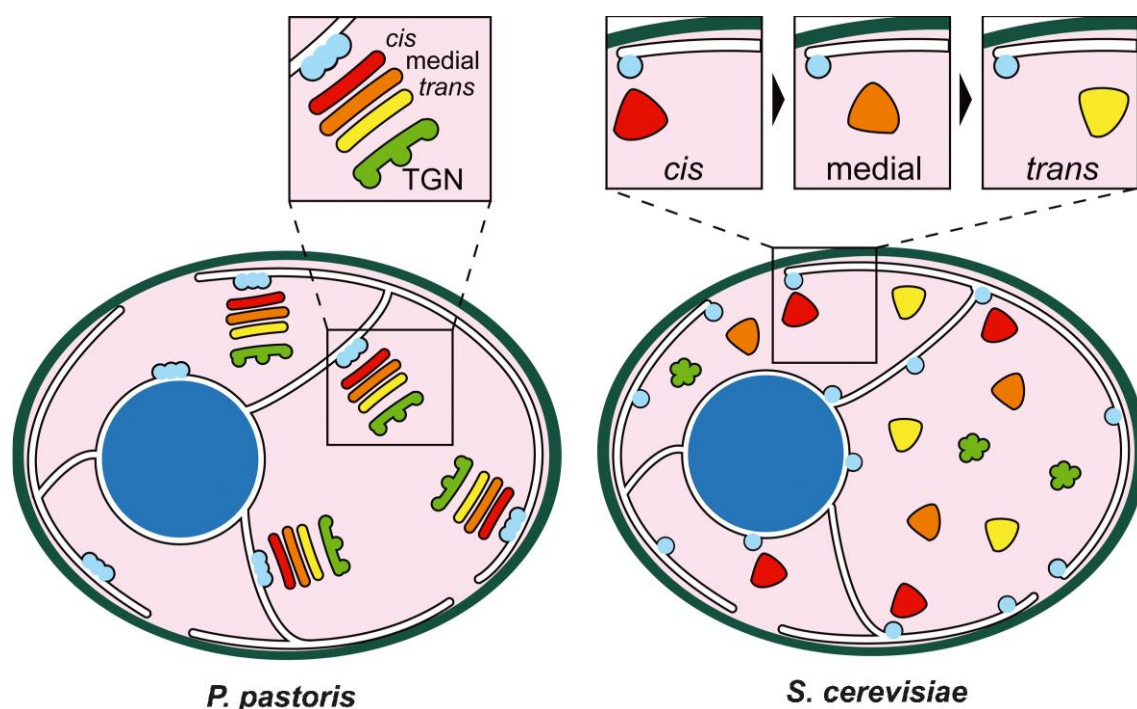


Рисунок 14 – модель строения аппарата Гольджи и ЭПР у дрожжей *P. pastoris* и *S. cerevisiae* [52]¹⁴

В случае почкующихся дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* мембранные цистерны аппарата Гольджи рассеяны в цитоплазме. В зависимости от локализации, состава и функций различают несколько видов цистерн Гольджи: цис- (cis), медиа- (medial) и транс- (trans) (рис. 14). Эти виды цистерн Гольджи

¹⁴ Условные обозначения на рисунке: виды цистерн Гольджи: cis – цис, medial – медиа, trans – транс; TGN – транс-сеть аппарата Гольджи

характеризуются разным набором ферментов, имеют свои биохимические особенности и отвечают за строго определенные реакции [52].

Белки, синтезированные в эндоплазматическом ретикулуме, упаковываются для дальнейшего транспорта на определенных участках гладкого ЭПР – ERES (Endoplasmic Reticulum Exit Site). Строение ERES отличается у разных видов дрожжей (голубые элементы на рис.14). Так, например, у *P. pastoris* ERES представляет собой 2-5 отдельных пятен, в то время как у *S. cerevisiae* – это множество маленьких пятен, распределенных по поверхности ЭПР, чаще – в местах максимальной кривизны.

В качестве транспортного носителя синтезированных белков выступают везикулы COPII (Coat Protein Complex II). Данный тип везикул отвечает за перенос белков к цис-мембране аппарата Гольджи или промежуточному сайту ERGIC (Endoplasmic Reticulum Golgi Intermediate Compartment). Перенос белка от эндоплазматического ретикулума к аппарату Гольджи или к его компартменту ERGIC называется антероградным переносом, в отличие от обратного переноса резидентных белков в везикулах COPI, который носит название ретроградного переноса. Полностью модифицированные белки сортируются на транспортные носители в транс-сети Гольджи (TGN). Важно не путать транс-сеть Гольджи (TGN) с транс-цистерной Гольджи (рис. 14). Современные данные говорят о том, что TGN необходимо рассматривать как независимую органеллу [53].

Динамика аппарата Гольджи. По одной из гипотез формирования АГ транспортировка грузов по эндоплазматическому ретикулуму происходит в специальных везикулах COPII и COPI. А цистерны аппарата Гольджи являются стабильными отсеками. Эта модель носит название модели везикулярного транспорта [54]. Согласно другой гипотезе, цис-цистерна Гольджи образуется «*de novo*» из ERES сайта ЭПР, а затем последовательно созревает в медиа- и транс-цистерны, которые распределяются в цитоплазме (рис.14). Такая модель носит название модели цистернального созревания [52,54]. Согласно этой гипотезе, транспортируемые белки остаются в цистернах аппарата Гольджи, которые постепенно созревают в транс-формы. Механизмы, которые обеспечивают созревание цистерн аппарата Гольджи, до сих пор не ясны, но сам процесс созревания визуализирован с помощью флуоресцентной конфокальной микроскопии [55,56].

Таким образом, секреторный путь синтезированных в ЭПР белков начинается с сайтов ERES, откуда белки в везикулах COPII направляются во временный компартмент Гольджи (ERGIC) или напрямую к цис-цистерне Гольджи. Эти белки модифицируются и обрабатываются ферментами Гольджи. Как правило, имеют место протеолитические преобразования и реакции гликозилирования [57]. Протекающие реакции строго упорядочены, что связано с созреванием цистерн Гольджи от цис- до медиа- и транс-форм. Для каждой из них характерны свои биохимические особенности и активные ферменты. После завершения обработки грузы отправляются в транс-сети

аппарата Гольджи (TGN), откуда в транспортных везикулах отправляются в конечный пункт назначения [51-54,57,58].

Интересно, что ранние и поздние элементы АГ наследуются разными путями. Поздние элементы АГ перемещаются актинозависимым транспортом в направлении области активного роста, к предполагаемому месту формирования почки и далее - к верхушке почки.

Ранние элементы АГ не проявляют такой направленности к участкам роста, но обнаруживаются в почках на ранних стадиях клеточного цикла. На сегодняшний день это принято объяснять тем, что ранние компартменты АГ не наследуются от материнской клетки как поздние, а синтезируются «*de novo*» внутри почек, являясь дополнительным подкреплением модели цистернального созревания [59].

Контрольные вопросы

1. В чем заключается принципиальное различие в организации аппарата Гольджи у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и *Pichia pastoris*?
2. Перечислите типы цистерн аппарата Гольджи и поясните, с какими биохимическими процессами они ассоциированы.
3. Что такое ERES-сайты и транспортные везикулы COPII? Какую роль они играют?
4. В чем суть модели цистернального созревания аппарата Гольджи?
5. Как наследуются ранние и поздние элементы аппарата Гольджи в процессе клеточного цикла?

1.7 Митохондрии

На сегодняшний день считается, что митохондрии имеют эндосимбиотическое происхождение, то есть произошли от свободно живущей протеобактерии, которая была поглощена эукариотической клеткой [60].

Эти органеллы - классические компартменты эукариотической клетки. Митохондрии известны как «энергетическое депо» клетки за их роль в синтезе большей части клеточного АТФ за счет локализации в них цикла трикарбоновых кислот (ЦТК). Однако роль митохондрий значительно шире. Митохондрии участвуют в целом ряде метаболических процессов: аминокислотный и липидный обмен, поддержание окислительно-восстановительного потенциала клеток, синтез железосернистых кластеров и гема, а также сопутствующие, связанные с вышеуказанными, функции, например, транспорт метаболитов через митохондриальные мембраны, метаболизм активных форм кислорода и прочее [61].

Митохондрии состоят из двух мембран - внутренней и внешней. Благодаря этому митохондрии имеют две полости: межмембранное пространство и, собственно, митохондриальный матрикс. Эти органеллы интересны своими адаптивными свойствами. В зависимости от условий культивирования и востребованности биохимических процессов,

протекающих в этих органеллах, митохондрии способны к слиянию или делению.

Морфология митохондрий сложна и достаточно динамична. Чаще всего они представляют собой вытянутые трубочки, иногда связанные между собой [62,63]. Митохондрии способны менять свою форму и размер, перемещаться внутри клетки по цитоскелетным путям [62,63]. Механизмы, регулирующие морфологию и распределение митохондрий, помогают оптимизировать работу этих органелл в ответ на внутриклеточные потребности в зависимости от условий культивирования.

Митохондрии - единственные органеллы, имеющие свой собственный геном. Митохондриальная ДНК составляет примерно 15% от общего содержания ДНК в клетке [61, 64]. Митохондриальная ДНК представлена в виде небольших фрагментов разной длины, а также кольцевой ДНК [61,64,65]. В ходе эволюции часть митохондриальных генов была перенесена в ядро. Поэтому большинство генов, кодирующих митохондриальные белки, находятся именно в ядре. Непосредственно в митохондриях *S. cerevisiae* сосредоточены гены, участвующие в дыхании, окислительном фосфорилировании и трансляции. Митохондриальная ДНК кодирует 8 белков, 7 из которых являются участниками цепи переноса электронов и окислительного фосфорилирования, а один является рибосомным белком малой субъединицы [66].

При этом не менее 1000 митохондриальных белков кодируются в ядре клетки, синтезируется на цитоплазматических рибосомах и оттуда транспортируется к месту применения, в соответствующий митохондриальный компартмент.

Динамика митохондрий. Митохондрии относятся к группе органелл, которые не могут быть синтезированы «*de novo*». Поэтому их наследование является важной частью клеточного цикла. Кроме того, морфология митохондрий во многом определяется протекающими процессами слияния или деления в зависимости от условий культивирования и метаболизма.

В *S. cerevisiae* эти органеллы формируют так называемый митохондриальный ретикулум (митохондриальную сеть), то есть совокупность митохондрий клетки, расположенных под цитоплазматической мембраной. Митохондриальная сеть обладает достаточной динамичностью и демонстрирует равномерное распределение между материнской и дочерней клетками при размножении, цитокинезе [66-69].

На первом этапе процесса наследования митохондриальная сеть поляризуется в направлении образующейся почки и проникает в почку, как только она появляется (рис.15).

Во время роста почки митохондрии продолжают двигаться вдоль оси материнской клетки и закрепляются на верхушке почки. При этом идет вытягивание митохондриальной сети в сторону, противоположную почке, то есть к верхушке материнской клетки. Этот процесс напоминает движение

хромосом во время кариокинеза. Непосредственно перед цитокинезом митохондрии высвобождаются от кончика почки [68, 70-72].

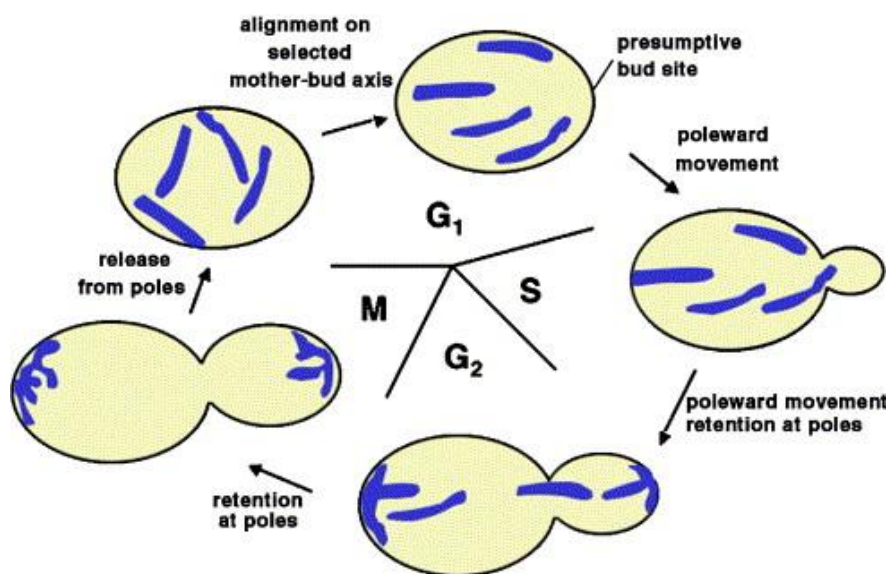


Рисунок 15 - Цикл наследования митохондрий у почкующихся дрожжей [68]¹⁵

Показано, что в этом процессе актиновые нити обеспечивают направленность перемещений митохондрий и равномерность распределения в ходе цитокинеза. Различные варианты мутаций, нарушающие или изменяющие актиновый скелет клетки (актиновый цитоскелет), приводят к нарушению подвижности и распределения митохондрий в процессе размножения [67,68,72].

Как отмечалось выше, митохондрии - очень динамичные структуры, которые способны менять морфологию, распределение и активность в зависимости от биохимических потребностей клетки. Под динамикой митохондрий часто понимают сбалансированные процессы слияния и деления.

В аэробных условиях митохондрии образуют сеть взаимосвязанных, дыхательно-компетентных органелл (рис.16 - справа). Такая сеть обеспечивает распространение метаболитов, ферментов и продуктов митохондриальных генов по всему компартменту митохондрий, что способствует оптимизации функций митохондрий [73-75].

Потеря функции слияния приводит к фрагментации органелл (рис.16 - слева) из-за продолжающегося размножения и сопутствующего ему деления. Деление митохондрий играет важную роль в удалении поврежденных органелл путем аутофагии [74,75].

¹⁵ Условные обозначения на картинке: alignment on selected mother-bud axis – выравнивание вдоль оси материнской клетки и будущей почки; presumptive bud site – предполагаемое место образования почки; poleward movement – перемещение митохондрий к полюсам; poleward movement retention at poles – продолжение движения митохондрий к полюсам; retention at poles - удержание митохондрий на полюсах; release from poles - освобождение митохондрий от полюсов; G₁, S, G₂, M – фазы клеточного цикла

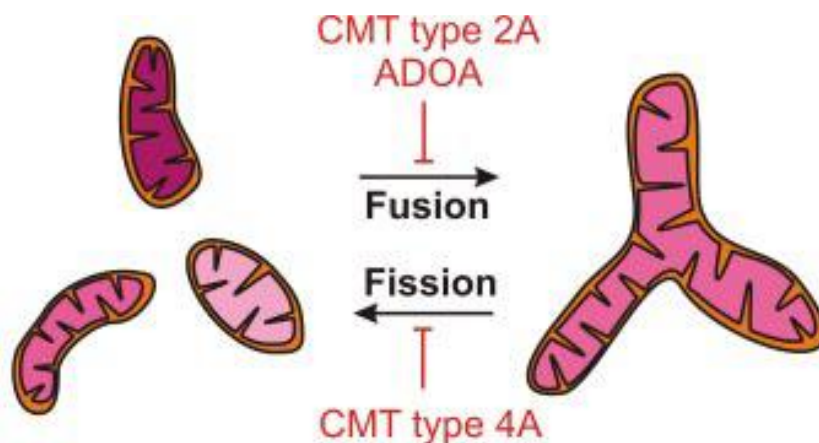


Рисунок 16 – Морфология митохондрий дрожжей *S. cerevisiae* в условиях деления и слияния [73]¹⁶

С другой стороны, при отсутствии баланса в процессах деления и слияния митохондрий фрагментированные митохондрии в конечном итоге теряют митохондриальную ДНК (мтДНК). Механизм этого процесса до сих пор не установлен [62,76].

Таким образом, сбалансированные процессы слияния и деления важны для поддержания целостности мтДНК и биоэнергетической функции митохондрий [74,75].

Контрольные вопросы

1. Почему митохондрии называют «энергетическим депо» клетки? Какие функции выполняют эти органеллы?
2. Что происходит с морфологией митохондрий при нарушении баланса между процессами слияния и деления?
3. Опишите процессы наследования митохондрий в зависимости от стадий клеточного цикла дрожжей.
4. Опишите роль актинового цитоскелета в наследовании митохондрий при почковании *S. cerevisiae*.

1.8 Вакуоли

Вакуоли дрожжей – эндоцитарные органеллы, которые могут быть сопоставлены с вакуолью растительной клетки и лизосомами млекопитающих. Функции вакуолей у *S. cerevisiae* достаточно обширны. Эти органеллы задействованы в обороте и рециркуляции белков; хранении, перемещении и деградации метаболитов; осморегуляции и поддержании цитозольного гомеостаза ионов и pH [70, 77, 78]. Вакуоли достаточно динамичны. В

¹⁶ Условные обозначения на рисунке: Cytokinesis – цитокинез; Development – развитие; Apoptosis – апоптоз; Dissipation of energy - рассеивание энергии; Calcium signaling - кальциевая сигнализация; Development – развитие; Defense against aging -защита от старения; Fusion – слияние; Fission – деление

процессе жизнедеятельности дрожжей *S. cerevisiae* вакуоли могут занимать значительную часть объема дрожжевой клетки (от 10% и более в зависимости от условий), менять свой размер, количество и локализацию в клетке. Дрожжи используют эти изменения в процессах адаптации к изменяющимся условиям окружающей среды [77].

С точки зрения строения вакуоли представляют собой достаточно просто организованные мембранные полые структуры. Современные молекулярно-генетические методы исследований сделали возможным идентификацию, расшифровку липидов, белков и белковых комплексов, ответственных за основные функции вакуолей, за процессы их слияния, деления и перемещения [70,71,77, 79].

Основные метаболические процессы клетки, в которых задействованы вакуоли, по механизму реализации можно разделить на 4 группы (рис.17).

1. Часть вакуольных белков — это ферменты, ответственные за расщепление сложных биологических молекул, то есть, аналогично лизосомам млекопитающих, выполняют «пищеварительные» функции в клетке. Материал для подобной биодеградациии поступает в вакуоль в так называемых эндосомах или превакуолярных структурах (путь 1 на рис.17).

2. Некоторые вновь синтезированные белки попадают в вакуоль из аппарата Гольджи, минуя эндосомы (путь 2 на рис.17).

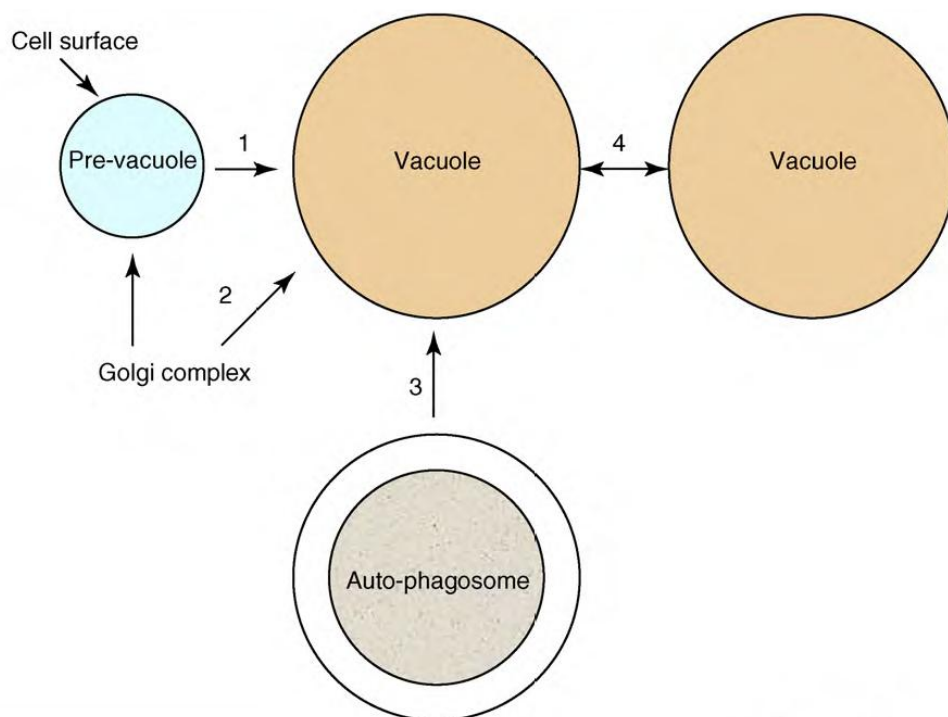


Рисунок 17 – Клеточные процессы, реализуемые в связи с вакуолями [77]¹⁷

¹⁷ Условные обозначения на рисунке: Cell surface – поверхность клетки; Pre-vacuole – превакуоль; Goldgi complex – Аппарат Гольджи; Vacuole – вакуоль; Auto-phagosome - аутофагосома

3. Для двух белков вакуоли (аминопептидаза и маннозидаза) реализуется третий путь транспорта, минуя ЭПР. Эти 2 белка образуются в цитоплазме, после чего обволакиваются двойной мембраной для транспортировки в вакуоль. Этот же механизм реализуется в процессах аутофагии, когда целые фрагменты клетки могут быть заключены в мембрану для дальнейшего транспорта полученной аутофагосомы в вакуоль для деградации (путь 3 на рис.17)

4. Четвертый процесс – это путь слияния вакуолей. В отличие от первых трех рассматриваемых механизмов, где предполагалось слияние гетеротипичных мембран, слияние вакуолей – гомотипичный процесс, подразумевающий слияние компартментов идентичного строения. Примером могут быть процессы слияния и деления вакуолей, реализуемые дрожжами *S. cerevisiae* в процессах адаптации к внешним условиям, являясь нормальным механизмом динамики вакуолей (путь 4 на рис.17).

Динамика вакуолей. На рис. 18 представлена модель наследования вакуолей у дрожжей *S. cerevisiae*. Известно, что при исследовании мутантных штаммов, в которых нарушены пути наследования вакуолей, почка дрожжей способна генерировать вакуоль «*de novo*» [79]. Но эволюционно более выгодным энергетически является процесс наследования вакуолей от материнской клетки к дочерней.

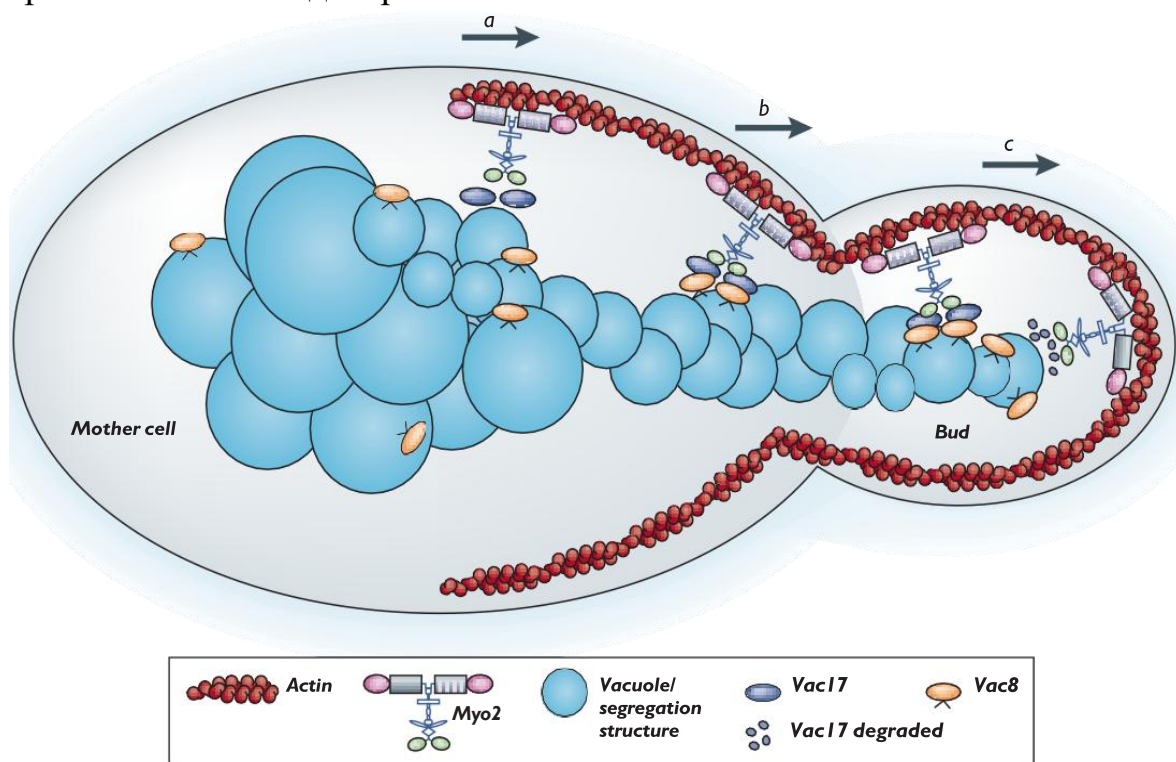


Рисунок 18 – Модель наследования вакуолей в клетке дрожжей *S. cerevisiae* [79]¹⁸

¹⁸ Условные обозначения на рисунке: Actin – актин; Mother – материнская клетка; Bud – почка; Myo2 – белок миозина; Vacuole / segregation structure – вакуоль/ структура сегрегации

На стадии G1 клеточного цикла, перед появлением почки, вакуоли выравниваются вдоль поляризованного актинового цитоскелета (рис.18). При этом часть вакуолей локализуется непосредственно в области будущей почки.

С появлением почки в S фазе образуется специализированная вакуолярная «структура сегрегации» [70,80,81], представляющая собой пузырьково-трубчатые выступы от родительской вакуоли, которые расположены вблизи почки и после формирования непосредственно направляются в формирующуюся дочернюю клетку [70,82].

Перенос вакуолярного материала продолжается в течение стадий S и G2 клеточного цикла и приводит к накоплению многочисленных пузырьков в почке. Наследование прекращается путем исчезновения «структуры сегрегации», открепления якоря координации направленного движения вакуолей на вершине почки и последующее слияние поступивших в почку пузырьков с образованием новых вакуолей дочерней клетки [70,83].

Вышеприведенное описание динамики вакуолей свидетельствует о схожести с процессами наследования других мембранных структур клетки (например, митохондрий) и координируется актиновым цитоскелетом клетки. Двигателем процесса наследования является белок миозин класса V, Myo2. Myo2 также отвечает за перемещение секреторных везикул, поздних структур Гольджи, пероксисом, а также задействован в наследовании митохондрий [79,83].

Контрольные вопросы

1. Перечислите основные функции вакуолей в клетке *Saccharomyces cerevisiae*.
2. Опишите процесс наследования вакуолярного материала от материнской клетки к дочерней. Какие белковые структуры обеспечивают направленное движение вакуолей?
3. Чем отличается гомотипичное слияние вакуолей от гетеротипичного? Приведите примеры.
4. Какую роль играет белок Myo2 в процессах наследования вакуолей и других органелл (митохондрий, пероксисом)?
5. Что такое «структура сегрегации» вакуолей, и на какой стадии клеточного цикла она формируется?

1.9 Пероксисомы

Пероксисомы являются обязательными органеллами дрожжей *S. cerevisiae* и происходят из эндоплазматического ретикулума. Пероксисомы выполняют различные биохимические функции, связанные с метаболизмом липидов [84]. Так, пероксисомы участвуют в β -окислении жирных кислот и метаболизме перекиси водорода [70].

Морфологически пероксисомы представляют собой небольшие органеллы, ограниченные мембраной и содержащие набор ферментов, необходимых для осуществления их биохимических функций [85].

Динамика пероксисом. Динамика пероксисом регулируется в соответствии со стадиями клеточного цикла. Как только на поверхности материнской клетки начинает наклёвываться почка, иммобилизованные в цитозоле пероксисомы начинают направленное движение в сторону почки (рис.19). Такой процесс наследования продолжается примерно до тех пор, пока половина пероксисом не переместится в дочернюю клетку.

Как и в случае направленного деления вакуолей, миграция пероксисом происходит вдоль актинового цитоскелета дрожжевой клетки и управляется миозином V класса, Myo2p.

Изначально пероксисомы группируются на верхушке растущей почки. Далее, по мере увеличения объема почки, пероксисомы начинают распределяться по всему объему клетки. Перед цитокинезом несколько пероксисом перемещается к шейке почки, как в материнской, так и в дочерней клетках.

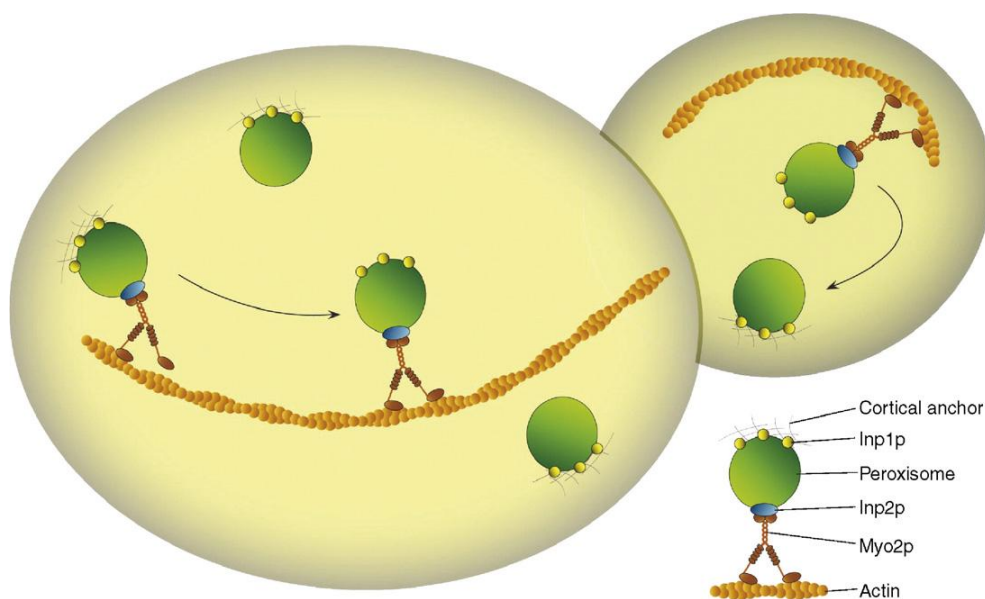


Рисунок 19 – Модель наследования пероксисом в клетке дрожжей *S. cerevisiae* [86]¹⁹

Остальные пероксисомы остаются иммобилизованными в кортексе клеток. Показано, что подобная согласованность между перемещением и удержанием пероксисом обеспечивается работой двух белков: Inp1p и Inp2p.

Inp1p представляет собой периферический белок мембраны пероксисом и отвечает за иммобилизацию этих органелл в матриксе клетки, демонстрируя сродство к цитозолю.

¹⁹ Условные обозначения на рисунке: Cortical anchor – кортикальный якорь; Peroxisome – пероксисома; Белки: Inp1p, Inp2p, Myo2p; Actin – актин (актиновая нить)

Inp2p идентифицирован как интегральный белок мембран пероксисом, необходимый для перемещения пероксисом в почку. Inp2p функционирует как специфичный рецептор пероксисом для связывания с мотором перемещения Myo2p.

Прекращение движения пероксисом связано с разборкой транспортных комплексов, аналогично процессам наследования вакуолей [84-88].

Контрольные вопросы

1. Какие биохимические процессы локализованы в пероксисомах дрожжей *S. cerevisiae*?
2. Как происходит направленное перемещение пероксисом из материнской клетки в почку?
3. Чем различаются функции белков Inp1p и Inp2p в динамике пероксисом?
4. Каким образом регулируется прекращение движения пероксисом перед цитокинезом?

1.10 Рибосомы

Рибосомы представляют собой немембранные органеллы, рибонуклеопротеиновые комплексы, функцией которых является синтез белков, то есть трансляция хранящейся в геноме информации для создания протеома клетки.

Рибосомы дрожжей *S. cerevisiae* содержат РНК (около 5500 нуклеотидов) и 79 разных белков. Рибосомы состоят из 2 субъединиц: большая 60S и малая 40S.

Традиционно в обозначении рибосом и рРНК применяются значения их коэффициентов седиментации, равные отношению скорости их осаждения к приложенному ускорению при центрифугировании. Показатель измеряется в сведбергах (S) и является косвенной характеристикой веса частицы. Интересно, что коэффициенты седиментации не обладают свойством аддитивности. Так, у дрожжей *S. cerevisiae* большая и малая субъединицы рибосом имеют коэффициенты седиментации 60S и 40S соответственно. При этом коэффициент седиментации рибосомы, полученный сборкой этих субъединиц, равен 80S, что связано с уменьшением площади итоговой частицы после сборки субъединиц.

Функция малой субъединицы - объединение матричной РНК (мРНК) и аминокислотированных транспортных РНК (тРНК). В большой субъединице происходит пептидилтрансферазная реакция, то есть собственно образование пептидной связи.

Динамика рибосом. Каждую минуту в быстрорастущей дрожжевой клетке синтезируется более 2000 рибосом. Клетка не только успешно производит эти органеллы, но и имеет механизмы контроля правильности их сборки. Нарушение процессов регуляции сборки рибосом может приводить к

частичной или полной потери их функций, что может быть смертельно для клетки.

Образование функциональных рибосомных единиц 40S и 60S берёт свое начало в ядрышке клетки, продолжают в нуклеоплазме и завершаются в цитоплазме клетки. В процессе задействовано около 200 факторов сборки, под которыми понимают белки с различным спектром биохимической активности: эндо- и экзо- нуклеазы, ГТФ-азы, АТФ-зависимые РНК-геликазы, киназы и др. Процессы сборки завершаются формированием вторичной и третичной структур большой и малой субъединиц [89,90].

В заключение хочется отметить, что с развитием современных методов исследования появляется все больше возможностей для изучения морфологии дрожжей *S. cerevisiae*. Накопление актуальных данных в этой области дает дополнительный ключ к пониманию биохимических процессов, лежащих в основе метаболизма дрожжей.

Контрольные вопросы

1. Из каких двух субъединиц состоит рибосома *S. cerevisiae* и каковы их коэффициенты седиментации?
2. Назовите компартменты клетки, в которых происходит сборка функциональных рибосом (от начала до завершения)?
3. Почему коэффициент седиментации целой рибосомы (80S) не равен сумме коэффициентов седиментации её субъединиц (40S и 60S)?
4. Какие последствия для клетки может иметь нарушение регуляции сборки рибосом?

Глава 2. Лабораторные работы

2.1 Лабораторная работа «Исследование активности и морфологии митохондрий дрожжей»

Митохондрии – динамичные органеллы клетки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Их структура напрямую зависит от метаболических потребностей клетки. В аэробных условиях, для интенсификации синтеза АТФ, митохондрии дрожжей образуют сложную разветвленную сеть. Краситель янус зеленый В (Janus Green В) помогает визуализировать митохондрии, так как он способен менять цвет в зависимости от окислительно-восстановительного состояния среды. В присутствии кислорода и активных ферментов митохондрий (цитохромоксидазы) краситель остается в окисленной форме — сине-зеленого цвета. В цитоплазме, где идут восстановительные процессы, он обесцвечивается.

Цель работы: сравнить состояние митохондриальной сети дрожжей в условиях ферментации (брожения) и активного клеточного дыхания.

Оборудование и реактивы:

- дрожжи хлебопекарные (сухие или прессованные);
- световой микроскоп (увеличение 1000-1600х с иммерсией);
- витальный краситель: янус зеленый В (Janus Green В) разведение 1:10 000;
- растворы глюкозы/сахарозы (5%) и этанола/глицерина (1%);
- термостат, лабораторный шейкер;
- предметные и покровные стекла, пипетки, фильтровальная бумага.

Ход работы.

1. Подготовка культур

Для проведения лабораторной работы необходимо подготовить две культуры дрожжей:

- культура «Б» (брожение): навеску дрожжей вносят в 5 % раствор углевода из расчета 0,5 г абсолютно сухой биомассы дрожжей на 100 мл раствора. Культуру в закрытой колбе (используют колбы со стравливающей давление крышкой типа Sigma или устанавливают пробку с гидрозатвором) помещают в термостат при температуре 30 °С на 30-60 минут.

- культура «Д» (дыхание): навеску дрожжей вносят в 1 % раствор этанола или 1% раствор глицерина из расчета 0,5 г абсолютно сухой биомассы дрожжей на 100 мл раствора. Культуру закрывают ватно-марлевой пробкой. Культивирование ведут при температуре 30 °С на 30-60 минут и активном перемешивании.

2. Витальная микроскопия

Каплю исследуемой дрожжевой суспензии дрожжей помещают на предметное стекло. Добавляют каплю красителя янус зеленый В (1:10 000). Через 5–7 минут препарат накрывают покровным стеклом, удаляют излишки жидкости фильтровальной бумагой, оперативно приступают к микроскопированию.

3. Обработка результатов

При наличии технической возможности делают микрофотографии полученных препаратов.

Результаты наблюдений вносят в таблицу:

Параметр сравнения	Культура «Б» (брожение)	Культура «Д» (дыхание)
Описание микроскопической картины		
Интенсивность окраски		
Дополнительные комментарии (при необходимости)		

Формулируют выводы.

Контрольные вопросы

1. Почему при избытке глюкозы дрожжи *S. cerevisiae* снижают митохондриальную активность?
2. Как строение крист митохондрий связано с эффективностью работы этих органелл?
3. Почему краситель Янус зеленый В со временем обесцвечивается даже в митохондриях культуры «Д», если накрыть препарат покровным стеклом слишком плотно?

2.2 Лабораторная работа «Цитофизиологическое исследование вакуолярного аппарата дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*»

Вакуоли — ключевые органеллы дрожжевой клетки, ответственные за гомеостаз, деградацию макромолекул и хранение запасных веществ. Данная работа направлена на изучение морфологии, функций и динамики этих органелл.

Вакуоли дрожжей — это крупные мембранные компартменты клетки. Они выполняют следующие функции:

- гидролитическая: содержат протеазы, нуклеазы и фосфатазы для деградации полимеров;
- депонирующая: накопление аминокислот, ионов (K^+ , Cl^-) и полифосфатов;
- гомеостатическая: регуляция внутриклеточного рН и осмотического давления.

Цель работы: изучить морфологию вакуолярного аппарата дрожжей, освоить методы прижизненного окрашивания органелл и пронаблюдать реакцию вакуолей на изменение условий среды (осмотический шок).

Оборудование и реактивы:

суспензия дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*;
краситель нейтральный красный (0,1% водный раствор);
раствор сахарозы (1М) или NaCl (10%);
дистиллированная вода;
световой микроскоп;
предметные и покровные стекла, пипетки, фильтровальная бумага.

Ход работы.

1. Прижизненное окрашивание вакуолей

Каплю разбавленной дрожжевой суспензии наносят на предметное стекло. Добавляют каплю 0,1% водного раствора красителя нейтрального красного. Препарат накрывают покровным стеклом. Через 5–7 минут препарат микроскопируют при увеличении 400х-640х или 1000-1600х (масляная иммерсия). При наличии технической возможности делают микрофотографии полученных препаратов. Фиксируют наблюдения в отчете (вакуоли окрашиваются в розово-красный цвет, в то время как цитоплазма остается почти бесцветной).

2. Наблюдение осмотических явлений

На новом предметном стекле готовят препарат «раздавленная капля». С одной стороны покровного стекла добавляют каплю 1М раствора сахарозы, а с противоположной стороны покровного стекла оттягивают жидкость фильтровальной бумагой.

Препарат микроскопируют, при наличии технической возможности делают микрофотографии исходного препарата и препарата после добавления гипертонического раствора. Фиксируют наблюдения в отчете.

После добавления гипертонического раствора в препарат вносят дистиллированную воду и наблюдают процесс деплазмолиза. Наблюдения фиксируют.

4. Обработка результатов

В отчете по лабораторной работе приводят полученные микрофотографии или рисунки клеток. Формулируют выводы о морфологии вакуолей и реакции исследуемых органелл на изменение условий среды (осмотический шок).

Контрольные вопросы

1. Какие функции выполняют вакуоли в клетке дрожжей *S. cerevisiae*?
2. Почему нейтральный красный накапливается именно в вакуолях, а не в цитоплазме?
3. Как изменяется структура вакуолярного аппарата при переходе дрожжей от логарифмической фазы роста к стационарной фазе?
4. Что такое процесс аутофагии и как в нем задействована вакуоль?
5. Какие гипертонические растворы используются в работе? В чем их предполагаемое воздействие на дрожжи *S. cerevisiae*?

2.3 Лабораторная работа «Микроскопическое исследование запасных питательных веществ в клетках дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*»

Классическое прижизненное окрашивание метиленовым синим по ГОСТ Р 71326 позволяет определить количество нежизнеспособных клеток, но не дает представления об их физиологическом состоянии. Данная работа направлена на изучение цитологии дрожжевой клетки и освоение методов селективного окрашивания клеточных включений. Запасные вещества накапливаются в клетках в периоды активного питания и расходуются при голодании.

Гликоген: полисахарид, распределенный в цитоплазме. При избытке углеводов может занимать значительную часть клетки.

Волютин (полифосфаты): служит резервом фосфора и энергии. Накапливается в вакуолях в виде гранул. Обладает метахромазией (способностью менять цвет красителя).

Липиды: высокоэнергетический резерв, может визуализироваться в виде капель (гранул) в цитоплазме клетки.

Цель работы: изучить локализацию основных запасных веществ (гликогена, волютина и липидов) в клетке дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* с помощью методов световой микроскопии.

Оборудование и реактивы:

суточные и недельные культуры дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, выращенные на жидких или агаризованных средах;

раствор Люголя

метиленовый синий по Леффлеру

раствор красителя Судан III

световой микроскоп;

предметные и покровные стекла, пипетки, бактериологические петли, спиртовки, фильтровальная бумага.

Приготовление растворов красителей.

Раствор Люголя: калия йодид (3 г) растирают в ступке с небольшим количеством воды, добавляют йод кристаллический (1 г), вновь растирают и затем количественно переносят в темную посуду и доводят объем до 300 мл. Раствор годен 30 суток.

Раствор красителя Судан III: 0,5 г Судан III растворяют в 100 мл этилового спирта.

Насыщенный раствор метиленового синего готовят, как указано в ГОСТ Р 71326 (3 г метиленового синего разводят в 100 мл этилового спирта, выдерживают несколько дней в темном месте до полного растворения).

Метиленовый синий по Леффлеру готовят из насыщенного раствора метиленового синего (30 мл) с добавлением 1 мл 1% раствора гидроксида натрия и 100 мл воды.

Ход работы.

1. Выявление гликогена

На предметное стекло наносят каплю дрожжевой суспензии. Добавляют каплю раствора Люголя, накрывают покровным стеклом. Препарат микрофотографируют при увеличении 400х-640х. Делают микрофотографии полученных препаратов. Фиксируют наблюдения в отчете. Гликоген в клетках окрашивается в красно-бурый или коричневый цвет.

2. Выявление волютина (Метод Леффлера)

Готовят фиксированный препарат дрожжей. Препарат окрашивают метиленовым синим (по Леффлеру) в течение 3–5 минут после чего промывают водой, высушивают. Микрофотографирование ведут при увеличении 1000-1600х (масляная иммерсия), делают микрофотографии. Наблюдения фиксируют в отчете. Цитоплазма окрашивается в бледно-голубой цвет, а гранулы волютина — в красно-фиолетовый (проявление метакромазии). Для большего дифференцирования окрашенный препарат допускается обрабатывать 1% раствором серной кислоты (в этом случае цитоплазма клетки обесцвечивается).

3. Выявление запасных липидов

Наносят суспензию дрожжей на предметное стекло, добавляют каплю раствора Судана III. Препарат накрывают покровным стеклом, микрофотографируют, фиксируют наблюдения. Липидные капли окрашиваются в оранжевый или красный цвет, цитоплазма остается бесцветной.

4. Обработка результатов

В отчете по лабораторной работе приводят полученные микрофотографии или рисунки клеток с выявленными включениями. Делают заключение о количестве запасных веществ в суточной и недельной культурах дрожжей, формулируют вывод о физиологическом состоянии дрожжевых культур.

Результаты наблюдений вносят в таблицу:

Анализируемые клеточные включения	Суточная культура	Недельная культура
Гликоген		
Волютин		
Липиды		
Заключение		
Вывод		

Контрольные вопросы

1. Почему волютин называют «парахроматином»?
2. Поясните роль фосфора в метаболизме дрожжей *S. cerevisiae*.
3. Какие условия культивирования способствуют максимальному накоплению липидов у дрожжей?
4. Какова биологическая роль гликогена в процессе спиртового брожения?
5. Как количество запасных питательных веществ дрожжевой культуры отражается на её физиологическом состоянии?

2.4 Лабораторная работа «Оценка степени автолиза дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* методом окраски по Граму»

Автолиз — это процесс саморазрушения клеток под действием собственных гидролитических ферментов (протеаз, нуклеаз, глюканаз). В биотехнологии контроль автолиза достаточно важен. С одной стороны, автолиз может быть нежелательным процессом (при хранении жидких дрожжей), с другой стороны, он может представлять собой целевой индуцированный этап в процессах получения дрожжевых экстрактов и биологически активных компонентов клетки дрожжей.

Оценка степени автолиза дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* методом окраски по Граму (Liu X. Y. et al.) основана на изменении проницаемости клеточной стенки в результате автолиза [91].

Грамположительное (Гр⁺) окрашивание: жизнеспособные клетки дрожжей с интактной клеточной стенкой и плотной цитоплазмой прочно удерживают комплекс генцианвиолета и йода, окрашиваясь в темно-фиолетовый цвет.

Грамотрицательное (Гр⁻) окрашивание: клетки, подвергшиеся автолизу, имеют поврежденную клеточную стенку и измененную цитоплазму. В этом случае краситель легко вымывается спиртом, и после окрашивания фуксином такие клетки становятся розово-красными.

Цель работы: освоить методику окраски по Граму для дифференциации живых и автолизированных дрожжевых клеток и научиться рассчитывать степень автолиза для исследуемых дрожжевых суспензий.

Оборудование и реактивы:

15% (масс.) суспензии дрожжей с разной степенью автолиза (например, контроль – без проведения автолиза и суспензия, выдержанная при 50 – 55 °С в течение 24–48 часов);

Набор красителей для окраски по Граму: генциановый фиолетовый карболовый (генциан-виолет), раствор Люголя, обесцвечивающий раствор 96% этиловый ректификованный спирт, контрастный краситель (фуксин основной карболовый - фуксин Циля);

световой микроскоп;

иммерсионное масло;

предметные и покровные стекла, пипетки, бактериологические петли, спиртовки, фильтровальная бумага.

Ход работы:

1. Приготовление фиксированного мазка

На чистое предметное стекло наносят микробиологической петлей каплю исследуемой дрожжевой суспензии. Равномерно распределяют суспензию и высушивают мазок на воздухе. Фиксируют мазок, трижды быстро проведя удерживаемое пинцетом предметное стекло через пламя спиртовки (белки денатурируют и фиксируют препарат).

2. Окрашивание по Граму

На фильтровальную бумагу, наложенную на мазок, наносят генцианвиолет (1–2 мин). После снимают бумагу, сливают краситель и наносят раствор Люголя (1–2 мин). Далее следует этап обесцвечивания препарата: мазок промывают 96% спиртом в течение 20–30 секунд, пока не перестанет отделяться фиолетовый краситель. Препарат промывают водой. На заключительной стадии препарат докрашивают нанесением фуксина Циля (1–2 мин). Промывают водой и высушивают.

3. Микроскопирование

Препарат микроскопируют с иммерсионным объективом (увеличение 1000х–1600х). В рассматриваемых полях зрения выявляют:

- фиолетовые клетки – неповрежденные, полноценные клетки;
- розовые клетки, розовые аморфные скопления – поврежденные, автолизированные клетки;
- мраморные, розово-фиолетовые, неравномерно окрашенные клетки – клетки с незначительными повреждениями.

4. Обработка результатов

Для определения степени автолиза (А, %) необходимо подсчитать не менее 500 клеток в разных полях зрения. Расчет ведут по формуле:

$$A = \frac{N_{\text{роз}}}{N_{\text{общ}}} \times 100\%,$$

где $N_{\text{роз}}$ – количество розовых клеток;

$N_{\text{общ}}$ – общее количество клеток.

В некоторых случаях, в ходе эффективного протекания процессов автолиза, клетки теряют целостность и не визуализируются как самостоятельные клеточные единицы. Поэтому полученное таким образом значение степени автолиза имеет характер относительный. Тем не менее, подобная количественная оценка является удобным инструментом и позволяет сравнивать эффективность различных режимов автолиза.

В отчете по лабораторной работе приводят полученные микрофотографии препаратов дрожжевых культур после проведения окраски по Граму. Рассчитывают степень автолиза, формулируют выводы.

Результаты вносят в таблицу:

Число клеток в анализируемых полях зрения	Наименование анализируемого образца	
	Контроль (автолиз 0ч)	Опыт (автолиз 24ч)
Общее число клеток		
Фиолетовых (Гр ⁺)		
Розовых (Гр ⁻)		
А - степень автолиза, %		

Контрольные вопросы

1. Почему при воздействии спирта комплекс генцианвиолета с йодом вымывается именно из автолизированных клеток, тогда как в неповрежденных клетках он удерживается?
2. Как изменятся результаты окрашивания препаратов (соотношение фиолетовых и розовых клеток), если процесс автолиза проводить при температуре 60 °С и выше? Обоснуйте ответ, учитывая природу ферментов-гидролаз.
3. Какие еще показатели, кроме степени автолиза, могут подтвердить эффективность проведения процесса распада клеточных структур?

Список использованных источников

1. Knop M. Yeast cell morphology and sexual reproduction—A short overview and some considerations //Comptes rendus biologiques. – 2011. – Т. 334. – №. 8-9. – С. 599-606.
2. Ohnuki S. et al. Dynamic changes in brewing yeast cells in culture revealed by statistical analyses of yeast morphological data //Journal of bioscience and bioengineering. – 2014. – Т. 117. – №. 3. – С. 278-284.
3. Kurtzman C., Fell J. W., Boekhout T. (ed.). The yeasts: a taxonomic study. – Elsevier, 2011.
4. Osiewacz H. D. et al. (ed.). Molecular biology of fungal development. – M. Dekker, 2002. – Т. 15.
5. Neiman A. M. Ascospore formation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* //Microbiology and Molecular Biology Reviews. – 2005. – Т. 69. – №. 4. – С. 565-584.
6. Klis F. M., Boorsma A., De Groot P. W. J. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae* //Yeast. – 2006. – Т. 23. – №. 3. – С. 185-202.
7. Lesage G., Bussey H. Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae* //Microbiology and molecular biology reviews. – 2006. – Т. 70. – №. 2. – С. 317-343.
8. Orlean P. Architecture and biosynthesis of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall //Genetics. – 2012. – Т. 192. – №. 3. – С. 775-818.
9. Cappellaro C. et al. Mating type-specific cell-cell recognition of *Saccharomyces cerevisiae*: cell wall attachment and active sites of a-and alpha-agglutinin //The EMBO journal. – 1994. – Т. 13. – №. 20. – С. 4737-4744.
10. Osumi M. The ultrastructure of yeast: cell wall structure and formation //Micron. – 1998. – Т. 29. – №. 2-3. – С. 207-233.
11. Klis F. M. et al. Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae* //FEMS microbiology reviews. – 2002. – Т. 26. – №. 3. – С. 239-256.
12. Yamaguchi M. et al. Structome of *Saccharomyces cerevisiae* determined by freeze-substitution and serial ultrathin-sectioning electron microscopy //Journal of electron microscopy. – 2011. – Т. 60. – №. 5. – С. 321-335.
13. Kollár R. et al. Architecture of the yeast cell wall: The linkage between chitin and β (1 \rightarrow 3)-glucan (*) //Journal of Biological Chemistry. – 1995. – Т. 270. – №. 3. – С. 1170-1178.
14. Klis F. M. Cell wall assembly in yeast //Yeast. – 1994. – Т. 10. – №. 7. – С. 851-869.
15. Cabib E. Two novel techniques for determination of polysaccharide cross-links show that Crh1p and Crh2p attach chitin to both β (1-6)-and β (1-3) glucan in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall //Eukaryotic Cell. – 2009. – Т. 8. – №. 11. – С. 1626-1636.
16. Magnelli P., Cipollo J. F., Abeijon C. A refined method for the determination of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall composition and β -1, 6-glucan fine structure //Analytical biochemistry. – 2002. – Т. 301. – №. 1. – С. 136-150.

17. Osmond B. C., Specht C. A., Robbins P. W. Chitin synthase III: synthetic lethal mutants and “stress related” chitin synthesis that bypasses the CSD3/CHS6 localization pathway //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1999. – T. 96. – №. 20. – C. 11206-11210.
18. Canetta E., Walker G. M., Adya A. K. Correlating yeast cell stress physiology to changes in the cell surface morphology: atomic force microscopic studies //The Scientific World Journal. – 2006. – T. 6. – C. 777-780.
19. Casamayor A., Snyder M. Bud-site selection and cell polarity in budding yeast //Current opinion in microbiology. – 2002. – T. 5. – №. 2. – C. 179-186.
20. De Nobel J. G. et al. The glucanase-soluble mannoproteins limit cell wall porosity in *Saccharomyces cerevisiae* //Yeast. – 1990. – T. 6. – №. 6. – C. 491-499.
21. de Nobel H. et al. Cell wall perturbation in yeast results in dual phosphorylation of the Slt2/Mpk1 MAP kinase and in an Slt2-mediated increase in FKS2–lacZ expression, glucanase resistance and thermotolerance //Microbiology. – 2000. – T. 146. – №. 9. – C. 2121-2132.
22. Odani T. et al. Mannosylphosphate transfer to cell wall mannan is regulated by the transcriptional level of the MNN4 gene in *Saccharomyces cerevisiae* //FEBS letters. – 1997. – T. 420. – №. 2-3. – C. 186-190.
23. Ferraz L. et al. The plasma membrane at the cornerstone between flexibility and adaptability: implications for *Saccharomyces cerevisiae* as a cell factory //Frontiers in Microbiology. – 2021. – T. 12. – C. 715891.
24. Athanasopoulos A. et al. Fungal plasma membrane domains //FEMS microbiology reviews. – 2019. – T. 43. – №. 6. – C. 642-673.
25. Renne M. F., de Kroon A. I. P. M. The role of phospholipid molecular species in determining the physical properties of yeast membranes //FEBS letters. – 2018. – T. 592. – №. 8. – C. 1330-1345.
26. Henry S. A., Kohlwein S. D., Carman G. M. Metabolism and regulation of glycerolipids in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* //Genetics. – 2012. – T. 190. – №. 2. – C. 317-349.
27. Tani M. Structure–function relationship of complex sphingolipids in yeast //Trends in Glycoscience and Glycotechnology. – 2016. – T. 28. – №. 164. – C. E109-E116.
28. Klug L., Daum G. Yeast lipid metabolism at glance //FEMS yeast research. – 2014. – T. 14. – №. 3. – C. 369-388.
29. Kodedová M., Sychrová H. Changes in the sterol composition of the plasma membrane affect membrane potential, salt tolerance and the activity of multidrug resistance pumps in *Saccharomyces cerevisiae* //PloS one. – 2015. – T. 10. – №. 9. – C. e0139306.
30. Coskun Ü., Simons K. Cell membranes: the lipid perspective //Structure. – 2011. – T. 19. – №. 11. – C. 1543-1548.
31. Stewart G. G., Stewart G. G. The structure and function of the yeast cell wall, plasma membrane and periplasm //Brewing and distilling yeasts. – 2017. – C. 55-75.

32. Ma M., Burd C. G. Retrograde trafficking and plasma membrane recycling pathways of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* //Traffic. – 2020. – T. 21. – №. 1. – C. 45-59.
33. Voeltz G. K., Rolls M. M., Rapoport T. A. Structural organization of the endoplasmic reticulum //EMBO reports. – 2002. – T. 3. – №. 10. – C. 944-950.
34. Austriaco, OP N. Endoplasmic reticulum involvement in yeast cell death //Frontiers in oncology. – 2012. – T. 2. – C. 87.
35. English A. R., Voeltz G. K. Endoplasmic reticulum structure and interconnections with other organelles //Cold Spring Harbor perspectives in biology. – 2013. – T. 5. – №. 4. – C. a013227.
36. Du Y., Ferro-Novick S., Novick P. Dynamics and inheritance of the endoplasmic reticulum //Journal of cell science. – 2004. – T. 117. – №. 14. – C. 2871-2878.
37. Schwarz D. S., Blower M. D. The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling //Cellular and molecular life sciences. – 2016. – T. 73. – C. 79-94.
38. Fehrenbacher K. L. et al. Endoplasmic reticulum dynamics, inheritance, and cytoskeletal interactions in budding yeast //Molecular biology of the cell. – 2002. – T. 13. – №. 3. – C. 854-865.
39. Lowe M., Barr F. A. Inheritance and biogenesis of organelles in the secretory pathway //Nature Reviews Molecular Cell Biology. – 2007. – T. 8. – №. 6. – C. 429-439.
40. West M. et al. A 3D analysis of yeast ER structure reveals how ER domains are organized by membrane curvature //Journal of Cell Biology. – 2011. – T. 193. – №. 2. – C. 333-346.
41. Prinz W. A. et al. Mutants affecting the structure of the cortical endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae* //The Journal of cell biology. – 2000. – T. 150. – №. 3. – C. 461-474.
42. Simon V. R., Karmon S. L., Pon L. A. Mitochondrial inheritance: cell cycle and actin cable dependence of polarized mitochondrial movements in *Saccharomyces cerevisiae* //Cell motility and the cytoskeleton. – 1997. – T. 37. – №. 3. – C. 199-210.
43. Rossanese O. W. et al. A role for actin, Cdc1p, and Myo2p in the inheritance of late Golgi elements in *Saccharomyces cerevisiae* //The Journal of cell biology. – 2001. – T. 153. – №. 1. – C. 47-62.
44. Taddei A., Gasser S. M. Structure and function in the budding yeast nucleus //Genetics. – 2012. – T. 192. – №. 1. – C. 107-129.
45. Heun P. SUMO Organization of the nucleus //Current opinion in cell biology. – 2007. – T. 19. – №. 3. – C. 350-355.
46. Rout M. P. et al. The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism //The Journal of cell biology. – 2000. – T. 148. – №. 4. – C. 635-652.

47. Oakes M. et al. Mutational analysis of the structure and localization of the nucleolus in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* //The Journal of cell biology. – 1998. – T. 143. – №. 1. – C. 23-34.
48. Shaw P., Doonan J. The nucleolus: Playing by different rules? //Cell cycle. – 2005. – T. 4. – №. 1. – C. 102-105.
49. Hildebrandt E. R., Hoyt M. A. Mitotic motors in *Saccharomyces cerevisiae* //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research. – 2000. – T. 1496. – №. 1. – C. 99-116.
50. Sobel S. G. Mini review: mitosis and the spindle pole body in *Saccharomyces cerevisiae* //Journal of Experimental Zoology. – 1997. – T. 277. – №. 2. – C. 120-138.
51. Emr S. et al. Journeys through the Golgi—taking stock in a new era //Journal of Cell Biology. – 2009. – T. 187. – №. 4. – C. 449-453.
52. Suda Y., Nakano A. The Yeast Golgi Apparatus //Traffic. – 2012. – T. 13. – №. 4. – C. 505-510.
53. Nakano A. The Golgi apparatus and its next-door neighbors //Frontiers in Cell and Developmental Biology. – 2022. – T. 10. – C. 884360.
54. Nakano A., Luini A. Passage through the Golgi //Current opinion in cell biology. – 2010. – T. 22. – №. 4. – C. 471-478.
55. Losev E. et al. Golgi maturation visualized in living yeast //Nature. – 2006. – T. 441. – №. 7096. – C. 1002-1006.
56. Matsuura-Tokita K. et al. Live imaging of yeast Golgi cisternal maturation //Nature. – 2006. – T. 441. – №. 7096. – C. 1007-1010.
57. Papanikou E., Glick B. S. The yeast Golgi apparatus: insights and mysteries //FEBS letters. – 2009. – T. 583. – №. 23. – C. 3746-3751.
58. Rodriguez-Boulan E., Müsch A. Protein sorting in the Golgi complex: shifting paradigms //Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research. – 2005. – T. 1744. – №. 3. – C. 455-464.
59. Rossanese O. W., Glick B. S. Deconstructing golgi inheritance //Traffic. – 2001. – T. 2. – №. 9. – C. 589-596.
60. Gray M. W., Burger G., Lang B. F. Mitochondrial evolution //Science. – 1999. – T. 283. – №. 5407. – C. 1476-1481.
61. Malina C., Larsson C., Nielsen J. Yeast mitochondria: an overview of mitochondrial biology and the potential of mitochondrial systems biology //FEMS yeast research. – 2018. – T. 18. – №. 5. – C. foy040.
62. Okamoto K., Shaw J. M. Mitochondrial morphology and dynamics in yeast and multicellular eukaryotes //Annu. Rev. Genet. – 2005. – T. 39. – №. 1. – C. 503-536.
63. Nunnari J. et al. Mitochondrial transmission during mating in *Saccharomyces cerevisiae* is determined by mitochondrial fusion and fission and the intramitochondrial segregation of mitochondrial DNA //Molecular biology of the cell. – 1997. – T. 8. – №. 7. – C. 1233-1242.
64. Williamson D. The curious history of yeast mitochondrial DNA //Nature Reviews Genetics. – 2002. – T. 3. – №. 6. – C. 475-481.

65. Westermann B. Mitochondrial inheritance in yeast // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. – 2014. – T. 1837. – №. 7. – C. 1039-1046.
66. Warren G., Wickner W. Organelle inheritance // *Cell*. – 1996. – T. 84. – №. 3. – C. 395-400.
67. Boldogh I. R. et al. Mitochondrial movement and inheritance in budding yeast // *Gene*. – 2005. – T. 354. – C. 28-36.
68. Boldogh I. R., Pon L. A. Interactions of mitochondria with the actin cytoskeleton // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. – 2006. – T. 1763. – №. 5-6. – C. 450-462.
69. Jensen R. E. et al. Yeast mitochondrial dynamics: fusion, division, segregation, and shape // *Microscopy research and technique*. – 2000. – T. 51. – №. 6. – C. 573-583.
70. Fagarasanu A., Rachubinski R. A. Orchestrating organelle inheritance in *Saccharomyces cerevisiae* // *Current opinion in microbiology*. – 2007. – T. 10. – №. 6. – C. 528-538.
71. Catlett N. L., Weisman L. S. Divide and multiply: organelle partitioning in yeast // *Current opinion in cell biology*. – 2000. – T. 12. – №. 4. – C. 509-516.
72. Fehrenbacher K. L. et al. Live cell imaging of mitochondrial movement along actin cables in budding yeast // *Current Biology*. – 2004. – T. 14. – №. 22. – C. 1996-2004.
73. Westermann B. Molecular machinery of mitochondrial fusion and fission // *Journal of Biological Chemistry*. – 2008. – T. 283. – №. 20. – C. 13501-13505.
74. Westermann B. Bioenergetic role of mitochondrial fusion and fission // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*. – 2012. – T. 1817. – №. 10. – C. 1833-1838.
75. Dong F. et al. Mitochondrial fusion and fission are required for proper mitochondrial function and cell proliferation in fission yeast // *The FEBS journal*. – 2022. – T. 289. – №. 1. – C. 262-278.
76. Osman C. et al. Integrity of the yeast mitochondrial genome, but not its distribution and inheritance, relies on mitochondrial fission and fusion // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2015. – T. 112. – №. 9. – C. E947-E956.
77. Armstrong J. Yeast vacuoles: more than a model lysosome // *Trends in cell biology*. – 2010. – T. 20. – №. 10. – C. 580-585.
78. Weisman L. S. Yeast vacuole inheritance and dynamics // *Annual review of genetics*. – 2003. – T. 37. – №. 1. – C. 435-460.
79. Weisman L. S. Organelles on the move: insights from yeast vacuole inheritance // *Nature reviews Molecular cell biology*. – 2006. – T. 7. – №. 4. – C. 243-252.
80. Weisman L. S. Organelles on the move: insights from yeast vacuole inheritance // *Nature reviews Molecular cell biology*. – 2006. – T. 7. – №. 4. – C. 243-252.
81. Michailat L., Mayer A. Identification of genes affecting vacuole membrane fragmentation in *Saccharomyces cerevisiae* // *PloS one*. – 2013. – T. 8. – №. 2. – C. e54160.

82. Catlett N. L., Weisman L. S. Divide and multiply: organelle partitioning in yeast //Current opinion in cell biology. – 2000. – T. 12. – №. 4. – C. 509-516.
83. Weisman L. S. Yeast vacuole inheritance and dynamics //Annual review of genetics. – 2003. – T. 37. – №. 1. – C. 435-460.
84. Fagarasanu A., Fagarasanu M., Rachubinski R. A. Maintaining peroxisome populations: a story of division and inheritance //Annu. Rev. Cell Dev. Biol. – 2007. – T. 23. – №. 1. – C. 321-344.
85. Hoepfner D. et al. A role for Vps1p, actin, and the Myo2p motor in peroxisome abundance and inheritance in *Saccharomyces cerevisiae* //The Journal of cell biology. – 2001. – T. 155. – №. 6. – C. 979-990.
86. Fagarasanu M., Fagarasanu A., Rachubinski R. A. Sharing the wealth: peroxisome inheritance in budding yeast //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research. – 2006. – T. 1763. – №. 12. – C. 1669-1677.
87. Fagarasanu A., Fagarasanu M., Rachubinski R. A. Maintaining peroxisome populations: a story of division and inheritance //Annu. Rev. Cell Dev. Biol. – 2007. – T. 23. – №. 1. – C. 321-344.
88. Fagarasanu M. et al. Inp1p is a peroxisomal membrane protein required for peroxisome inheritance in *Saccharomyces cerevisiae* //The Journal of cell biology. – 2005. – T. 169. – №. 5. – C. 765-775.
89. Woolford Jr J. L., Baserga S. J. Ribosome biogenesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* //Genetics. – 2013. – T. 195. – №. 3. – C. 643-681.
90. Konikkat S., Woolford Jr J. L. Principles of 60S ribosomal subunit assembly emerging from recent studies in yeast //Biochemical Journal. – 2017. – T. 474. – №. 2. – C. 195-214.
91. Liu X. Y., Wang Q., Cui S. W., Liu H. Z. A new isolation method of β -D-glucans from spent yeast *Saccharomyces cerevisiae* // Food Hydrocolloids. – 2008. – T. 22. – №. 2. – C. 239-247.

Содержание

Введение.....	3
Глава 1. Морфология дрожжей	5
1.1 Морфотипы дрожжей.....	6
1.2 Клеточная стенка.....	8
1.3 Цитоплазматическая мембрана.....	14
1.4 Эндоплазматический ретикулум	19
1.5 Ядро	23
1.6 Аппарат Гольджи.....	26
1.7 Митохондрии	28
1.8 Вакуоли	31
1.9 Пероксисомы	34
1.10 Рибосомы	36
2.1 Лабораторная работа «Исследование активности и морфологии митохондрий дрожжей».....	38
2.2 Лабораторная работа «Цитофизиологическое исследование вакуолярного аппарата дрожжей <i>Saccharomyces cerevisiae</i> »	39
2.3 Лабораторная работа «Микроскопическое исследование запасных питательных веществ в клетках дрожжей <i>Saccharomyces cerevisiae</i> »	41
2.4 Лабораторная работа «Оценка степени автолиза дрожжей <i>Saccharomyces cerevisiae</i> методом окраски по Граму»	43
Список использованных источников.....	46

Иванова Вера Анатольевна

**Морфология дрожжей.
Тинкториальные методы исследования**

Учебное пособие

В авторской редакции

Редакционно-издательский отдел Университета ИТМО

Зав. РИО

Н.Ф. Гусарова

Подписано к печати

Заказ №

Тираж

Отпечатано на ризографе

Редакционно-издательский отдел
Университета ИТМО
197101, Санкт-Петербург, Кронверкский пр., 49, литер А