УДК 577.3

ИЗУЧЕНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ИЗОЛИРОВАННЫХ ПЛАЗМАТИЧЕСКИХ МЕМБРАН ДРОЖЖЕЙ В ВИДИМОЙ ОБЛАСТИ СПЕКТРА

© 2008. **Пиняскина Е.В.**
Прикаспийский институт биологических ресурсов ДНЦ РАН

Спектральными методами в изолированных плазматических мембранах дрожжей обнаружено мембранно-связанное соединение, поглощающее в видимой области спектра. Зарегистрирована флуоресценция этого соединения с максимумом при 683 нм. Спектр возбуждения флуоресценции этого соединения имеет структуру, типичную для порфиринов. По ряду флуоресцентных свойств порфирин, локализованный в плазматической мембране, отличается от других внутриклеточных порфиринов (протопорфирин, копропорфирин).

The fluorescence with maximum at 683 nm from isolated yeast plasma membranes has been detected. The fluorescence was due to a membrane-bound compound absorbing in the visible range of the spectrum. The fluorescence excitation spectrum of this compound has a structure typical for porphyrins. in several fluorescence properties the porphyrin localized in the plasma membrane is different from other intracellular porphyrins (protoporphyrin, coproporphyrin).

Одной из глобальных проблем человечества является разрушение озонового слоя и, как следствие – увеличение интенсивности проникновения средневолнового ультрафиолета, обладающего канцерогенным действием. Среди многих экологических последствий разрушения озонового слоя особое значение имеет то обстоятельство, что даже слабое повышение интенсивности солнечного излучения значительно увеличивает эффективность деструктивных фотосенсибилизированных повреждений. Это требует изучения клеточных защитных механизмов, способных обеспечить устойчивость биологических систем при увеличении интенсивности солнечного УФ-излучения.

В последнее время все большее внимание уделяется фотодинамическим деструктивным реакциям, протекающим в биологических системах под действием света длинноволновой ультрафиолетовой (УФ) и видимой областей спектра. Это вызвано, с одной стороны, важной ролью фотодинамических процессов в реализации фототоксических и фотоканцерогенных эффектов в коже человека при действии солнечного излучения, а с другой – с разработкой и усовершенствование способов направленного фотоповреждения клеток и биологических структур (при фототерапии опухолей видимым светом в присутствии сенсибилизаторов порфириновой природы).

О молекулярных механизмах, лежащих в основе фотодинамических эффектов, сенсибилизируемых эндогенными порфиринами (при облучении клеток низкоинтенсивным красным светом) известно пока очень мало. Это в значительной мере связано с отсутствием данных о внутриклеточной локализации порфиринов, выступающих в качестве сенсибилизаторов.

Ранее было показано, что главной мишенью при инактивации дрожжевых клеток, вызываемой видимым светом, являются их плазматические мембраны [1, 4]. Известно, что сенсибилизированные фотодеструктивные реакции в первую очередь протекают во внутриклеточных структурах, с которыми сенсибилизатор ассоциирован. Это позволило предположить, что в клетках дрожжей порфирины, участвующие в запуске реакций, приводящих в итоге к летальному эффекту, локализованы в плазматических мембранах.

Для выяснения связи порфиринов с плазматическими мембранами в настоящей работе проведен спектрофлуориметрический анализ этих структур после их выделения из дрожжевых клеток.

Материалы и методы. ***Культура дрожжей.*** Использовали дрожжи *Candida guilliermondii* ВСБ-656 (культура получена во ВНИИсинтезбелок). Смыв клеток с суточного косяка (сусло-агар) вно-

сили в качалочные колбы со 100 мл жидкой питательной среды следующего состава (г/л): $NH_4H_2PO_4$-2 г, $(NH_4)_2HPO_4$- 0.5 г, K_2SO_4-0.2 г, $MgSO_4$-0.2 г; дрожжевой автолизат – 20 мл; сахароза – 1%; вода водопроводная (начальное значение pH 5,7). Дрожжи выращивали на качалке (230 об/мин) при 32°С в течение 8 ч до концентрации 10^8 кл/мл. Полученную культуру отмывали (1500 g, *5* мин) дважды от среды выращивания дистиллированной водой и 0,05 М фосфатным буфером (pH 7,0).

Изолированные плазматические мембраны дрожжей получали в соответствии с методикой, описанной в работе [5].

Экстракция порфиринов. К навеске плазматических мембран или отмытых целых клеток добавлялась смесь этилацетат – ледяная уксусная кислота (3:1 об/об). Экстракция проводилась на мешалке при 4°С в течение 5 ч. После центрифугирования (650 g, 15 мин) этилацетатный слой отделяли в делительной воронке, промывали дважды ледяной дистиллированной водой для удаления уксусной кислоты и встряхивали с равным объемом 3 М HC1. После разделения смеси на два слоя соляную кислоту отделяли (нижний слой), а оставшийся этил-ацетат повторно экстрагировали равным объемом 3 М HC1. Эта процедура позволяет перевести порфирины из этилацетата в соляную кислоту и провести их дальнейший анализ [6].

Хлороформенный экстракт из плазматических мембран получали при встряхивании (30 мин при 4°С) навески мембран со смесью хлороформ-метанол (2:1 об/об) и отделении хлороформенной фракции.

Реактивы. Использовали реактивы фирмы Sigma, органические растворители и кислоты отечественного производства специальной очистки, применяемые в хроматографических исследованиях.

Спектрофлуориметрия. Спектры флуоресценции и возбуждения флуоресценции снимали на спектрофлуориметре Hitachi-850. При анализе густых суспензий отмытых целых клеток(10^{10} кл/мл) и мембран (2 мг/мл) в 0,05 М фосфатном буфере использовали треугольную кварцевую кювету, которую располагали под углом 45° к направлению возбуждающего света. При спектрофлуориметрическом анализе экстрактов из плазматических мембран и клеток и использовали квадратную кварцевую кювету. Все спектры флуоресценции снимали при ширине щели возбуждения 6 нм и ширине щели флуоресценции 3 нм, а все спектры возбуждения флуоресценции – при 3 и 6 нм соответственно. С целью уменьшения побочных эффектов светорассеяния между возбуждающим светом и кюветой (за исключением возбуждения флуоресценции УФ-светом 280 нм) ставили светофильтр БС-7, пропускающий свет длин волн >350 нм. С той же целью на выходе флуоресценции устанавливали фильтр, пропускающий свет длин волн >430 нм. Спектры регистрировали с коррекцией, на низком усилении при скорости сканирования 120 нм/мм. Все используемые в работе реактивы были проверены и не содержали флюоресцирующих примесей в изучаемом нами диапазоне спектра.

Результаты и обсуждение. Спектрофлуориметрический анализ изолированных плазматических мембран дрожжей показал, что в них локализовано вещество, обладающее флуоресценцией в красной области спектра. Как видно на рис. 1 (кривая 1), спектр этой флуоресценции имеет один максимум при 683 нм; основной максимум в спектре ее возбуждения расположен в области 400 нм, что близко совпадает с полосой Соре для порфиринов. При изменении длины волны возбуждающего света в диапазоне 350-600 нм какой-либо другой флуоресценции плазматических мембран, за исключением указанной, мы не наблюдали. Вместе с тем возбуждение светом в УФ-области спектра с максимумом при 280 нм, соответствующим максимуму поглощения белков, приводило к появлению той же флуоресценции с пиком при 683 нм (рис. 1, кривая 2). На рис. 1 (кривая 3) представлен спектр флуоресценции целых клеток в красной области, зарегистрированный нами, как и в случае измерения флуоресценции плазматических мембран, при возбуждении светом с длиной волны 400 нм. Однако, как следует из сравнения двух спектров, спектр флуоресценции клеток характеризуется тремя максимумами: двумя главными (при 620 и 640 нм) и третьим пиком меньшей интенсивности при 690 нм. По данным литературы [3], это отражает наличие в клетках двух флуоресцирующих типов порфиринов копропорфиринов (главный максимум флуоресценции при 620 нм) и протопорфиринов (главный максимум флуоресценции при 640 нм).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что выявленная нами флуоресценция плазматических мембран обусловлена локализованным в них соединением (возможно, порфириновой природы), отличным от упомянутых типов порфиринов, содержащихся в других клеточных структу-

рах. Дополнительное подтверждение этого было получено при исследовании флуоресценции экстрактов из плазматических мембран.

Спектрофлуориметрический анализ кислотной фракции эфирного экстракта из плазматических мембран, полученной после добавления к нему соляной кислоты и последующего разделения смеси, показал, что эта фракция не обладает флуоресценцией в красной области спектра, т.е. флуоресцирующий компонент плазматических мембран в соляную кислоту из эфирного экстракта не переходит. В этом заключается отличие данного соединения от ряда других порфиринов, которые в кислой среде дают, как известно, характерные спектры флуоресценции [2]. В качестве иллюстрации на рис.2 приведен зарегистрированный нами спектрофлуоресценции кислотной фракции эфирного экстракта, полученного из целых клеток дрожжей. Как видно, он имеет максимумы при 605 и 660 нм, типичные для флуоресценции протопорфирина в кислой среде [2], и плечо при 620 нм, которое может быть отнесено к флуоресценции копропорфирина.

Другое отличие во флуоресцентных свойствах соединения, локализованного в плазматических мембранах, и других порфиринов, содержащихся в дрожжевых клетках, было установлено при излучении спектра флуоресценции хлороформенного экстракта из изолированных плазматических мембран. На рис. 3 (кривая 1) показано, что единственный максимум в этом спектре расположен при 671 нм, тогда как спектры флуоресценции протопорфирина и копропорфирина в хлороформе характеризуются главными максимумами соответственно при 638 и 625 нм и имеют дополнительные менее интенсивные пики в более длинноволновой области спектра [2].

Выше отмечалось, что внутриклеточные порфирины (протопорфирин, копропорфирин) переходят из эфирного экстракта в соляную кислоту (см. рис. 2). В оставшейся этилацетатной фракции флуоресценция данных порфиринов не обнаруживается. В противоположность этому этилацетатная фракция эфирного экстрактаиз плазматических мембран, оставшаяся после добавления к нему соляной кислоты и последующего разделения смеси, обладает флуоресценцией в красной области спектра с одним максимумом при 675 нм (рис. 3, кривая 2). Спектр возбуждения этой флуоресценции (рис. 4) имеет основной максимум при 410 нм и четыре менее интенсивных пика в области 500-620 нм, что характерно для соединений порфириновой природы. При возбуждении УФ-светом (280 нм) флуоресценция экстрагированного из плазматических мембран компонента не наблюдается. Приведенные выше данные показывают, связанный с плазматическими мембран, флуоресцирующий компонент отличается от внутриклеточных порфиринов (прото-, копропорфиринов). Это, прежде всего, выражается том, что в спектрах его флуоресценции как в составе мембран, так и в органических растворителях представлен только один максимум.

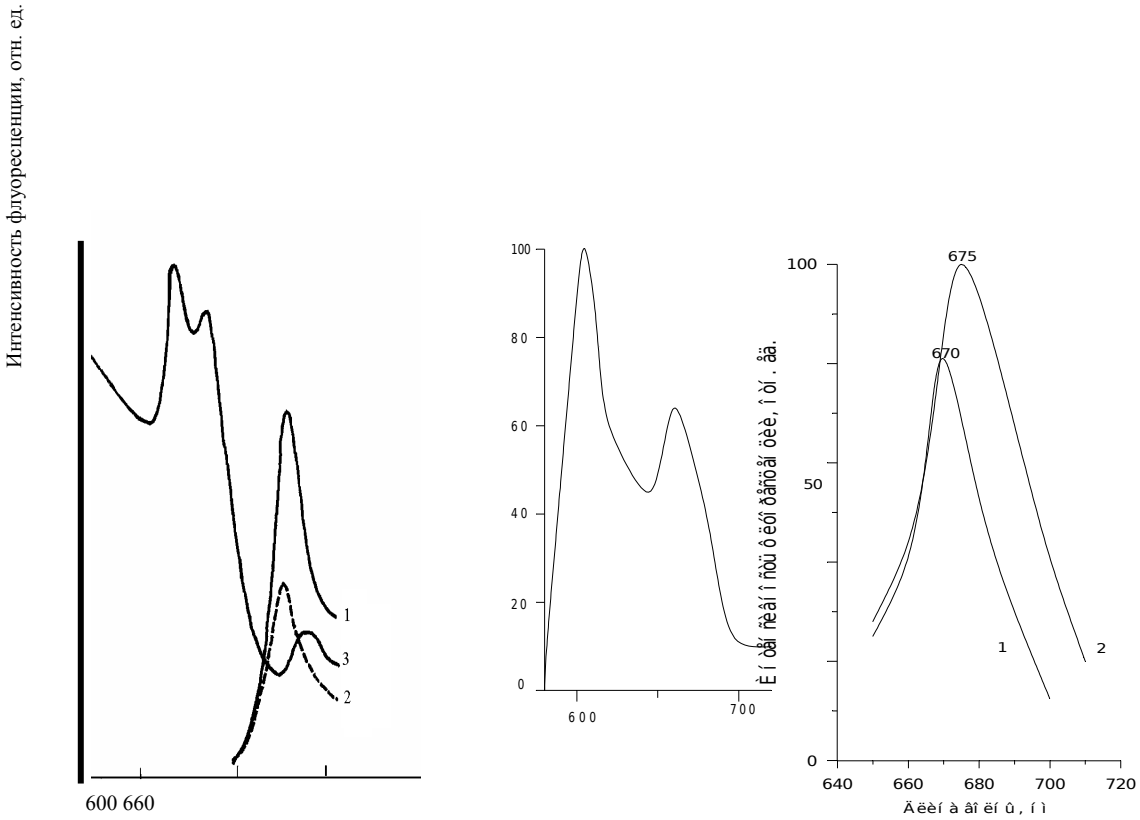

Рис. 1. Спектры флуоресценции изолированных плазматических мембран *(1,2)* и целых клеток *(3)* при возбуждении светом длиной волны 410 нм *(1,3)* или 280 нм (2). По оси ординат – интенсивность флуоресценции (I, отн.ед.), по оси абсцисс – длина волны (λ., нм).

Рис. 2. Спектр флуоресценции кислотной фракции эфирного экстракта из целых дрожжевых клеток (λвозб, 410 нм). Обозначения на осях те же, что на рис. 1

Рис. 3. Спектры флуоресценции хлороформенного экстракта (/) и этилацетатной фракции эфирного экстракта *(2)* из изолированных плазматических мембран (λвзоб= 410 нм)

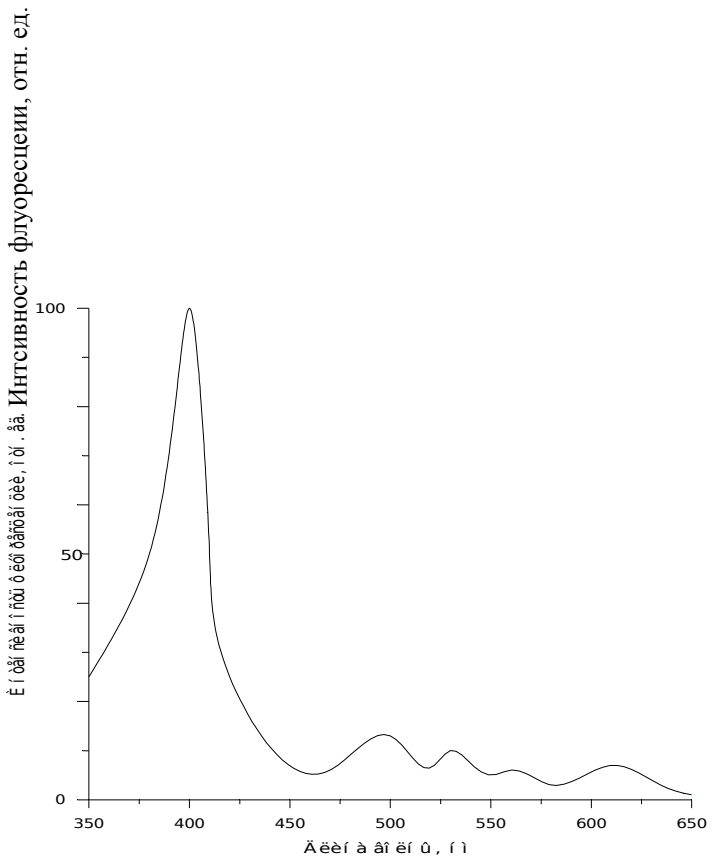

Рис. 4. Спектр возбуждения флуоресценции этилацетатного экстракта из изолированных плазматических мембран ($\lambda_{возб}$=675 нм)

Кроме того, в отличие от указанных порфиринов флуоресцирующий компонент плазматических мембран не переходит в кислотную фракцию эфирных экстрактов. С другой стороны, спектр возбуждения флуоресценции данного соединения обнаруживает структуру, типичную для аналогичных спектров порфириновых молекул, и это позволяет отнести его к соединениям порфириновой природы.

Нами показано, что при возбуждении УФ-светом (280 нм) экстрагированный из плазматических мембран компонент флуоресцирует. Однако в составе мембран наблюдается его флуоресценция в красной области спектра при 683 нм (см. рис.1, кривая 2*)*. Если учесть, что при длине волны 280 нм расположен максимум в спектре поглощения белков, то установленный факт можно рассматривать как указание на наличие миграции энергии от белка на порфирин и соответственно на его тесную связь с белковыми компонентами мембраны. Вместе с тем, данные о возможности экстрагирования этого порфирина неполярными растворителями (хлороформ) свидетельствуют о его гидрофобных свойствах. Таким образом, представляется вероятным, что в мембране молекулы порфирина локализованы между белковыми и липидными компонентами.

Идентификация мембранно-связанного порфирина и изучение молекулярных механизмов фотосенсибилизируемых им деструктивных реакций в белковых и липидных компонентах плазматических мембран – задача дальнейших исследований.

Библиографический список

1. *Беленикина Н.С., Кирпичникова Н.А., Тимофеев К.Н., Фрайкин Г.Я.* Фотоокисление липидов в плазматических мембранах дрожжей под действием видимого света // Биофизика. 1991. Т. 36. № 4. – С. 599-602. **2.** *Карнаухов В.Н.* Люминесцентный анализ клеток. – Пущино: Аналитическое микроскопия, 2002. – 131 с. **3.** *Манешин С.К, Аревшатян А.А.* Люминесценция порфиринов в дрожжах р. Candida, выращенных на углеводородах // Биофизика. 1972. Т. 17, вып.3. – С.352-354. **4.** *Поспелов М.Е., Туровецкий В.Б., Фрайкин Г.Я.* О роли повреждения мембран в инактивации дрожжевых клеток видимым светом // Микробиология. 1987. Т. 56. – С. 882-885. **5.** *Фрайкин Г.Я., Страховская М.Г., Пиняскина Е.В.* О локализации порфиринового соединения в плазматических мембранах дрожжей и его участии в фотосенсибилизации перекисного окисления липидов // Биохимия. 1995. Т. 60. № 7. – С.1155-1160. **6.** *Sandberg S., Romslo I., Hovding G. and Bjorndal T.* Porphyrin-induced photodamage as related to the subcellular localization of the porphyrins // Acta Dermatol. Supple. 1982. V.100. – P. 75-80.