

ВЛИЯНИЕ ГЛЮКОЗЫ И СОРБИТА НА ФОРМИРОВАНИЕ ЭЛЕКТРОПОР В ПЛАЗМАТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЕ ДРОЖЖЕЙ *Saccharomyces cerevisiae*

© 2018 г. А.Я. Валиахметов, А.О. Шепеляковская*

Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Скрябина РАН,
142290, Пушкино Московской области, просп. Науки, 5

*Филиал Института биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
142290, Пушкино Московской области, просп. Науки, 6

E-mail: airatv@ibpm.pushchino.ru

Поступила в редакцию 19.11.16 г.

Изучено влияние короткой (15 мин) преинкубации клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* с глюкозой на процесс формирования пор в плазматической мембране при электропорации. Формирование пор оценивалось по накоплению в клетках двух флуоресцентных красителей: этидия бромид (молекулярный радиус ~0,8 нм) и 70 кДа-FITC-декстрана (молекулярный радиус ~5,8 нм). Показано, что преинкубация с глюкозой снижает количество клеток, окрашиваемых этидием бромидом, и повышает количество клеток, окрашиваемых FITC-декстраном. Наблюдаемый эффект усиливается в среде, содержащей 1 М сорбита. Выяснено, что преинкубация с глюкозой приводит к значительному росту накопления обоих красителей в контрольных клетках, не подвергшихся электропорации. Сделан вывод, что преинкубация с глюкозой влияет как на общее число формируемых пор, так и на их размер.

Ключевые слова: дрожжи, электропорация, электропора, глюкозный эффект, FITC-декстран, восстановление мембраны.

Электропорация (электропермеабилитация) – это метод создания пор в биологической мембране под действием кратковременного электрического импульса. Физический механизм, лежащий в его основе, включает несколько этапов. После приложения короткого электрического импульса происходит перестройка липидного бислоя с образованием гидрофобной поры, которая быстро трансформируется в гидрофильную пору – заполненный водой трансмембранный канал [1]. Динамика порообразования, время жизни пор и зависимость их размера от силы и продолжительности электрического импульса хорошо изучены [2–7].

Метод электропорации клеток, с целью «загрузки» клетки соединениями, которые в норме не могут преодолеть барьер в виде мембраны, широко используется при проведении научных исследований, в биотехнологии, а в последнее время и в клинической практике [8–12]. Это обусловлено относительной простотой метода и быстрым восстановлением поврежденной мембраны. Другие методы пермеабилитации плазматической мембраны, такие как обработка

детергентами или порообразующими пептидами, приводят к необратимому нарушению ее целостности.

Методом проб и ошибок исследователями подобраны оптимальные условия для электропорации микроорганизмов. В современных приборах уже предустановлены параметры электрического импульса для различных типов бактерий и дрожжей. Исключение составляют животные клетки, для которых сила и продолжительность электрического импульса подбирается в каждом случае индивидуально. Также необходимо отметить критическую важность состава среды, в которой осуществляется электропорация. Большинство протоколов для электропорации включает в состав среды электронейтральные осмостабилизаторы, такие как сорбит, маннит, сахароза и т.д. Они необходимы для стабилизации бактериальных и животных клеток и предотвращения вытекания внутриклеточного содержимого после образования пор. В случае с дрожжевыми клетками осмостабилизаторы можно исключить из среды в силу наличия у дрожжей мощной клеточной стенки, которая предотвращает угрозу разру-

Сокращение: EtBr – этидий бромид.

шения клетки в среде с низкой осмотической концентрацией.

Таким образом, к настоящему времени исследователи располагают стандартизованными протоколами для эффективной электропорации клеток. В то же время наблюдаются вариации в эффективности электропорации клеток одного и того же типа. Например, в зависимости от возраста дрожжевой культуры и стадии жизненного цикла значительно меняются результаты воздействия электрического импульса на плазматическую мембрану [13]. Этот факт указывает на существенную роль физиологического статуса клетки в феномене электропорации. Одним из основных регуляторов метаболизма и физиологического статуса дрожжевой клетки является глюкоза. Клетки дрожжей при добавлении глюкозы кардинально меняют свой метаболизм [14–17]. Опубликованные к настоящему времени данные достаточно детально описывают роль глюкозы в регуляции активности мембраносвязанных ферментов, формировании трансмембранного потенциала и энергообеспечении транспорта необходимых веществ [18–22]. Удивительно, но влияние глюкозы на свойства самой мембраны практически не освещено в литературе. В частности, не изучены вопросы о влиянии глюкозы на проницаемость плазматической мембраны для низкомолекулярных соединений и динамику порообразования. Также нет данных о влиянии глюкозы на эффективность электропорации.

Целью данной работы являлось изучение влияния глюкозы на эффективность электропорации клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, а также изучение влияния осмостабилизатора сорбита на эффективность электропорации.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культура и условия роста. В работе использовали штамм *Saccharomyces cerevisiae* SEY6210 (MAT α ura3-52 leu2-3,112 his3- Δ 100 trp1- Δ 901 lys2-801suc2- Δ 9). Культуру выращивали на стандартной среде YPD (Sigma, США) в течение 16–18 ч (до поздней логарифмической стадии, $OD_{660} = 8–10$). Для измерения оптической плотности суспензию разбавляли в 40 раз. Клетки осаждали 5 мин при 5000 g, дважды промывали дистиллированной водой и ресуспендировали в воде категории MilliQ (18 МОм/см). После этого клетки инкубировали в воде в течение 1 ч при 28°C. Данный этап был необходим для полного удаления глюкозы из среды. Далее клетки осаждали, промывали два раза водой MilliQ и окончательно ресуспендировали в воде MilliQ в соотношении 1 г биомассы на 10 мл. В опытах

по изучению влияния сорбита клетки ресуспендировали в 1 М сорбите (Applichem, Германия) в том же соотношении.

Инкубация с глюкозой и электропорация. К 0,95 мл клеточной суспензии в воде MilliQ или 1 М сорбите добавляли 50 мкл 2 М раствора глюкозы (Applichem, Германия). Конечная концентрация глюкозы составляла 100 мМ. В контроль добавляли 50 мкл воды MilliQ. Образцы инкубировали в ThermoMixer (Eppendorf, Германия) при 28°C и 1000 об/мин в течение 15 мин. Затем клетки осаждали 2 мин при 13000 g и дважды промывали 1 мл холодной воды MilliQ или 1 М сорбита. Окончательно клетки ресуспендировали в 1 мл холодной воды MilliQ (1 М сорбита). 0,2 мл клеточной суспензии немедленно переносили в охлажденную в снегу 0,2-сантиметровую электропорационную кювету MicroPulser (Bio Rad, США). Электропорирование проводили на Eppendorf Eporator (Eppendorf, Германия) экспоненциальным импульсом напряженностью 7,5 кВ·см⁻¹. Продолжительность импульса равнялась 5,8 мс. После электропорации кювету немедленно помещали в снег и переносили образцы в охлажденные пробирки Эппендорф объемом 1 мл. 7 мкл образца отбирали и окрашивали, как будет описано ниже (точка «0 мин»). Пробирки с образцами переносили в ThermoMixer и инкубировали при 28°C и 1000 об/мин. Каждые 15 мин отбирали 7 мкл образца и окрашивали, как описано ниже.

Окрашивание клеток и проточная цитометрия. Для регистрации пор разного размера использовали два флуоресцентных красителя: этидиум бромид (EtBr) (Sigma, США; м. в. 394 Да, молекулярный радиус ~0,8 нм) и FITC-декстран (Sigma, США; м.в. 70 кДа, молекулярный радиус ~5,8 нм).

К 7 мкл клеточной суспензии добавляли 0,1 мл раствора EtBr (5 мкг/мл воды MilliQ или 1 М сорбита). Так как флуоресценция несвязанного с ДНК EtBr очень низкая, образцы анализировали на проточном цитометре BD Accuri C6 (BD Biosciences, США) без удаления красителя из среды. Флуоресценцию детектировали на канале FL2 (возбуждение – 488 нм, эмиссия – 585 нм). Для окрашивания клеток FITC-декстраном к 7 мкл клеточной суспензии добавляли 1 мкл 1 мМ раствора FITC-декстрана в воде MilliQ. Смесь инкубировали при комнатной температуре 5 мин. Добавляли 0,15 мл воды MilliQ (1 М сорбита) и осаждали клетки 30 с при 13000 g. Далее клетки дважды промывали 0,15 мл воды MilliQ (1 М сорбита) и окончательно ресуспендировали в 0,15 мл воды MilliQ (1 М сорбита). Суспензию пропускали

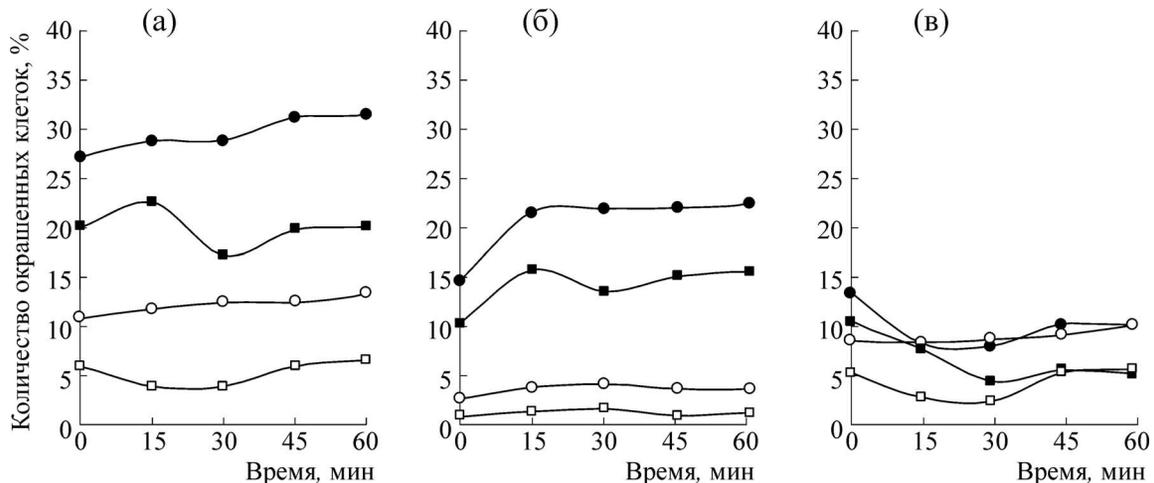


Рис. 1. Окраска клеток *S. cerevisiae* FITC-декстраном после 15 мин преинкубации со 100 мМ глюкозы (темные символы) и без преинкубации (светлые символы): (а) – окраска клеток, электропорированных в воде (квадраты) и 1 М сорбите (кружки); (б) – окраска контрольных (не порированных) клеток в воде (квадраты) и 1 М сорбите (кружки); (в) – окраска клеток FITC-декстраном, поступившим внутрь клетки только через электропоры (разность между (а) и (б), см. раздел «Результаты»).

через проточный цитометр и регистрировали флуоресценцию на канале FL1 (возбуждение – 488 нм, эмиссия – 533 нм). В контроле все вышеописанные этапы окраски проводили с клетками, не подвергавшимися электропорации. В каждой экспериментальной точке подсчитывали 100000 клеток.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние глюкозы и 1 М сорбита на накопление FITC-декстрана в электропорированные клетки *S. cerevisiae* SEY6210. В этой серии экспериментов изучали влияние преинкубации дрожжей с глюкозой на количество эффективно электропорированных клеток с порами диаметром не менее 5,8 нм – величина молекулярного радиуса 70 кДа-FITC-декстрана [9,23]. Как видно из графика на рис. 1а (темные символы), преинкубация дрожжей с глюкозой значительно увеличивала количество клеток, окрашенных FITC-декстраном. Количество клеток с порами, проницаемыми для FITC-декстрана в точке 0 (непосредственно после электропорации), возрастала с 11 до 27% в среде с сорбитом (рис. 1а – кружки) и с 6 до 20% в отсутствие сорбита (рис. 1а – квадраты). Присутствие в среде 1 М сорбита дополнительно увеличивало количество клеток с FITC-декстраном по сравнению с водой с 6 до 11% без преинкубации с глюкозой (рис. 1а – светлые символы) и с 20 до 27% после преинкубации с глюкозой (рис. 1а – темные символы). Продолжительная (до 60 мин) инкубация клеток в 1 М сорбите приводила к возрастанию количества клеток, проницаемых

для FITC-декстрана как после преинкубации с глюкозой, так и в ее отсутствие (рис. 1а – темные и светлые кружки). Количество клеток, проницаемых для FITC-декстрана, в воде оставалось примерно одинаковым на протяжении 60 мин, независимо от преинкубации с глюкозой (рис. 1а – темные и светлые квадраты). Таким образом, электропорация в присутствии 1 М сорбита была более эффективной. Объединенный эффект глюкозы и сорбита проявился в почти пятикратном увеличении (с 6 до 27%) числа клеток, окрашенных FITC-декстраном.

Однако для выявления реальной картины влияния преинкубации с глюкозой на эффективность электропорации необходимо учитывать порообразование в контрольных клетках, не подвергшихся воздействию электрического импульса (рис. 1б). Здесь мы наблюдали интересное явление. Количество клеток, окрашенных FITC-декстраном, после преинкубации с глюкозой было значительно больше, чем клеток, не обработанных глюкозой (рис. 1б – темные и светлые квадраты). При этом в среде с сорбитом их число было еще более значительным (рис. 1б – темные и светлые кружки). Количество клеток, способных накапливать FITC-декстран, не уменьшалось со временем инкубации, т.е. возможная модификация барьерных свойств плазматической мембраны после преинкубации с глюкозой имела долговременную природу. На рис. 1а, следовательно, показано накопление FITC-декстрана клетками дрожжей как через электропоры, так и через поры, образовавшиеся на мембране по естественным причинам. После вычитания соответ-

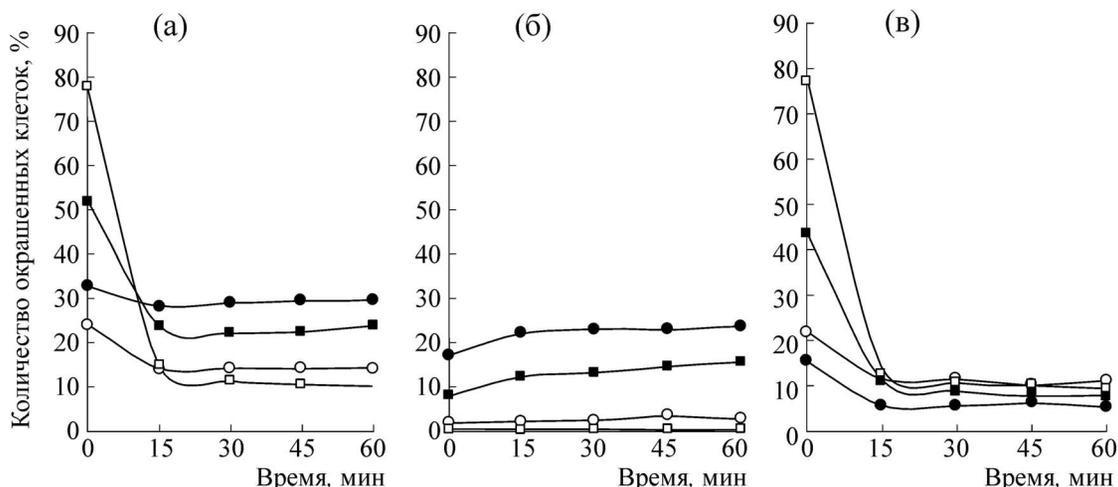


Рис. 2. Окраска клеток *S. cerevisiae* EtBr после 15 мин преинкубации со 100 мМ глюкозы (темные символы) и без преинкубации (светлые символы): (а) – окраска EtBr клеток электропорированных в воде (квадраты) и 1 М сорбите (кружки); (б) – окраска EtBr контрольных (не порированных) клеток в воде (квадраты) и 1 М сорбите (кружки); (в) – окраска клеток EtBr, поступившим внутрь клетки только через электропоры (разность между (а) и (б), см. раздел «Результаты»).

ствующих величин мы получили график накопления FITC-декстрана через электропоры (рис. 1в). Электрический импульс приводил к дополнительному образованию пор, доступных для FITC-декстрана, в относительно небольшом количестве клеток (таблица): 13% в сорбите после обработки глюкозой и 8% без глюкозы (рис. 1в, темные и светлые кружки); 10% в воде после обработки глюкозой и 5% в воде без глюкозы (рис. 1в, темные и светлые квадраты). Эффект преинкубации с глюкозой практически нивелировался к 30-й минуте, хотя количество клеток, проницаемых для FITC-декстрана, в среде с сорбитом приблизительно в два раза выше (таблица). Можно предположить, что электропоры являются относительно короткоживущими и исчезают к 30-й минуте. Это согласуется с данными других авторов [4,24–26].

Влияние глюкозы и 1 М сорбита на накопление EtBr в электропорированные клетки *S. cerevisiae* SEY6210. В этой серии экспериментов изучали влияния преинкубации дрожжей с глюкозой на количество эффективно электро-

порированных клеток с порами диаметром не менее 0,8 нм (молекулярный радиус EtBr).

Электропорация выглядит гораздо более эффективной при ее оценке по способности клеток окрашиваться EtBr (рис. 2а). В точке «0 мин» (непосредственно после приложения электрического импульса) количество порированных в воде клеток достигает 77% против 6%, оцененных по способности окрашиваться FITC-декстраном (рис. 1а и 2а, светлые квадраты). При порации в 1 М сорбите разница выражена более умеренно: 24% клеток, окрашенных EtBr, против 11%, окрашенных FITC-декстраном (рис. 1а и 2а, светлые кружки). Интересно, что результат преинкубации с глюкозой при оценке эффективности электропорации по окраске клеток EtBr выглядел более сложным. Эффективность электропорации в точке «0 мин» падала после преинкубации клеток с глюкозой в воде с 77 до 52% (рис. 2а, темные и светлые квадраты). Наличие в среде порации и инкубации 1 М сорбита значительно снижало общую эффективность электропорации (рис. 2а, кружки

Количество клеток (в % от общего числа) накопивших FITC-декстран или EtBr немедленно после электропорации (точка «0 мин») и через 15 мин (30 мин для FITC-декстрана) после электропорации

Краситель	Время после электропорации	Вода		1 М сорбит	
		– глюкоза	+ глюкоза	– глюкоза	+ глюкоза
EtBr	0 мин	77	44	22	16
	15 мин	14	12	12	6
FITC-декстран	0 мин	5	10	8	13
	30 мин	2	4	8	8

в точке «0 мин»). Но электропорация в присутствии 1 М сорбита клеток, преинкубированных с глюкозой, приводила к увеличению числа EtBr-проницаемых клеток с 24 до 33% клеточной популяции (рис. 2а, темные и светлые кружки). Таким образом, эффект глюкозы в воде и в среде с 1 М сорбитом был противоположным. Мембрана после электропорации восстанавливала целостность достаточно быстро. К 15-й минуте количество проницаемых для EtBr клеток в воде уменьшилось до 15% (без преинкубации с глюкозой) и 24% (после обработки глюкозой) (рис. 2а, темные и светлые квадраты). Примерно до этих величин уменьшилось к 15-й минуте и количество проницаемых для EtBr клеток после порации в 1 М сорбите: 14% без глюкозы и 29% с глюкозой (рис. 2а, темные и светлые кружки). Дальнейшая инкубация клеток в воде (или 1 М сорбите) не влияла на динамику восстановления целостности мембраны. Клетки после преинкубации с глюкозой и порированные в 1 М сорбите показали самую слабую динамику порообразования и восстановления целостности мембраны (рис. 2а, темные кружки). Их количество практически не менялось на протяжении двух часов наблюдения.

Как и в случае с накоплением FITC-декстрана, необходим учет количества пор, образовавшихся в отсутствие электрического импульса (рис. 2б). В этом случае влияние преинкубации с глюкозой на накопление EtBr вывилось очень наглядно (рис. 2б, темные значки). Накопление EtBr не уменьшалось на протяжении 60 мин, несмотря на отсутствие глюкозы в среде инкубации. Наблюдалась даже слабая положительная динамика. Очевидно, что количество клеток, накапливающих EtBr, в контроле (без приложения электрического импульса) достаточно большое и должно быть учтено. На рис. 2в представлены графики динамики восстановления целостности мембраны после вычитания контрольных значений. Клетки без преинкубации с глюкозой и порированные в воде показали наибольший темп восстановления мембраны (рис. 2в, светлые квадраты; таблица): количество клеток, окрашенных EtBr, уменьшилось с 77 до 14% в отсутствие глюкозы и с 44 до 12% после преинкубации с глюкозой. Сорбит сильно подавлял как процесс порации, так и процесс восстановления целостности мембраны. Немедленно после приложения электрического импульса накапливали краситель 22% клеток, не преинкубированных с глюкозой, и лишь 16% преинкубированных клеток (рис. 2в, темные и светлые кружки). К 15-й минуте эти показатели уменьшились примерно в два раза (12% без преинкубации с глюкозой и 6% после преин-

кубации). Начиная с 15-й минуты после электропорации, количество клеток, окрашиваемых EtBr, оставалось примерно одинаковым во всех четырех вариантах на протяжении 60 мин.

ОБСУЖДЕНИЕ

Как видно из представленных результатов, преинкубация с глюкозой и наличие в среде осмопротектора значительно изменяют эффективность электропорации дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. При оценке влияния глюкозы на эффективность электропорации следует принимать во внимание необычно высокий уровень порированности мембраны в контроле (рис. 1б и 2б, темные символы). Как видно из графиков, стабильное накопление FITC-декстрана и EtBr продолжалось на протяжении 60 мин. При этом клетки, не преинкубированные с глюкозой, практически не окрашивались красителями, что говорит об отсутствии пор на мембране. Здесь необходимо объяснить, почему была выбрана именно 15-минутная преинкубация дрожжей с глюкозой. Как было показано ранее, 15-минутная преинкубация дрожжей *S. cerevisiae* со 100 мМ глюкозы приводит к многократной активации Н-АТФазы плазматической мембраны [18]. Следствием этого является возрастание трансмембранного электрического потенциала $\Delta\mu_{H^+}$ (до -160 мВ) [27,28]. При удалении глюкозы из среды активность Н-АТФазы снижается до базового уровня также в течение 15 мин. Поскольку клетки в наших условиях после преинкубации были отмыты от глюкозы, мы ожидали исчезновение эффекта преинкубации с глюкозой в течение 15 мин. Однако этого не наблюдалось (рис. 1б и 2б, темные символы). Участие неспецифических транспортных систем в процессе накопления EtBr [29] и FITC-декстрана на большом временном промежутке в отсутствие глюкозы (основного источника энергии для клеточного метаболизма) – сомнительно. Возможно, что в этих условиях поступление красителей в клетку происходит через мембранные поры, сформировавшиеся в процессе инкубации с глюкозой. Мы не можем на данном этапе ответить на вопрос о конкретной причине интенсивного порообразования в присутствии глюкозы. Скорее всего, имеются несколько причин. Например, клетки в наших условиях находились в условиях дефицита азотных соединений, т.е. были не способны к росту. Возможно, это внесло свой вклад в поглощение FITC-декстрана и EtBr. Дрожжи *Filobasidiella neofortmans*, растущие на богатой среде, практически не накапливали EtBr [30]. Недавно было показано, что глюкоза стимулирует накопление EtBr

клетками *S. cerevisiae* [29]. Было предположено, что трансмембранный градиент ионов может индуцировать порообразование [31]. Глюкоза, стимулируя Н-АТФазу плазматической мембраны, приводит к формированию трансмембранного градиента протонов, что могло привести к образованию пор по предложенному теоретическому механизму. Также в присутствии глюкозы целлобиозолипид нарушал целостность плазматической мембраны *S. cerevisiae* в концентрации в четыре раза более низкой, чем в отсутствие глюкозы [32]. Опыты по накоплению FITC-декстрана в электропорированных и непорированных хлоропластах также показали значительное накопление красителя в интактных органеллах [33].

Влияние преинкубации с глюкозой на эффективность электропорации в воде после вычитания контрольных значений представлено на рис. 1в и 2в (квадраты). Очевидная разница в общем числе клеток, окрашенных EtBr или FITC-декстраном, позволяет предположить формирование по крайней мере двух типов пор. Мелкие поры, через которые в клетки поступал EtBr, образовались на значительно большем количестве клеток, чем крупные (не менее 5,8 нм диаметром) поры, через которые происходило накопление в клетках FITC-декстрана (таблица). Известно, что большие поры (до 30 нм диаметром) возникают после приложения продолжительного (миллисекунды) электрического импульса [6,7]. Процесс затягивания поры можно грубо разделить на три этапа: быстрое уменьшение размера (менее 1 с), дальнейшее уменьшение диаметра поры (несколько минут) и окончательное исчезновение поры в течение 10–20 мин [23,34]. Динамика восстановления целостности мембраны, оцененная по накоплению EtBr, хорошо вписывается в эту схему (рис. 2в). Подобная картина наблюдалась и при накоплении электропорированными дрожжами красителя Phloxine B [35]. Преинкубация с глюкозой значительно снижает эффективность электропорации: количество клеток, окрашенных EtBr, снижается с 77 до 44% (таблица). Динамика формирования и исчезновения больших пор (через которые в клетки поступает FITC-декстран) выражена не так ярко (рис. 1в, квадраты). Относительно небольшое количество клеток с большими порами может быть следствием того, что за время от электропорации до внесения красителя в среду часть больших пор успевает затянуться (или уменьшиться в диаметре и стать недоступными для FITC-декстрана) [36]. Тем не менее преинкубация с глюкозой приводит к двукратному возрастанию количества клеток, окрашенных FITC-декстра-

ном (таблица). Следовательно, преинкубация с глюкозой оказывает противоположный эффект на формирование мелких и больших пор. Для объяснения этого феномена важно учитывать следующее. Большинство теоретических и экспериментальных работ по электропорации выполнены на модельных системах, представляющих из себя простые бислоиные мембраны, состоящие из липидов одного класса, тогда как клеточная мембрана – это гетерогенный комплекс, состоящий из липидов различных классов (фосфолипиды, гликолипиды, стеролы) и белков. Латерально мембрана в высокой степени компартментализована и состоит из доменов с различным липидным составом [37]. Известно, что эффективность электропорации в значительной степени зависит от липидного состава мембраны и наличия на ней белков [38]. Метаболизм глюкозы приводит к радикальному изменению физиологии дрожжевой клетки. Выше отмечалось, что глюкоза активирует Н-АТФазу плазматической мембраны дрожжей, что сопряжено с выбросом протонов и локальным закислением среды. Однако АТФаза не распределена равномерно по всей мембране, а локализована в специфических доменах [37]. Таким образом, формируется сложная гетерогенная структура, в которой качественно различные белково-липидные домены имеют разное по химическому составу микроокружение. Учитывая это, можно предположить, что мелкие и большие поры формируются преимущественно в разных липидных доменах, которые реагируют на электрический импульс различным образом.

Сорбит широко применяется при трансформации клеток как осмопротектор. Представленные данные предполагают учет наличия осмолита в среде при оценке эффективности электропорации. Известно, что гиперосмотический шок может играть роль в реорганизации клеточной стенки, элементов цитоскелета и в порообразовании [39,40]. Также было показано, что комбинация осмотического стресса с электропорацией повышает эффективность трансформации [41,42]. Наши данные показывают, что 1 М сорбит значительно снижает количество клеток, окрашенных EtBr, т.е. снижает эффективность электропорации (рис. 2в, таблица). Противоречие между нашими и литературными данными можно объяснить тем, что эффективность электропорации у цитированных авторов определялась количеством трансформантов. В нашем случае мы оценивали эффективность по количеству окрашенных EtBr клеток. Как видно из представленных данных, электропорация после преинкубации с глюкозой и

1 М сорбитом происходит с наименьшей эффективностью (таблица). Только 16% клеток оказались проницаемыми для EtBr и 13% – для FITC-декстрана. Можно предположить, что в этих условиях (глюкоза + сорбит) мелкие поры вообще не формируются, и накопление EtBr в клетки происходит через большие поры. Причем это не электропоры, а поры, образовавшиеся естественным путем при инкубации с глюкозой и сорбитом (рис. 1б, темные кружки). К этому выводу нас приводит количественный анализ окрашенных клеток. 14% непорированных клеток после преинкубации с глюкозой и с 1 М сорбитом окрашиваются FITC-декстраном (рис. 1б, темный кружок в точке «0 мин»). Это число совпадает с количеством клеток, преинкубированных с глюкозой и сорбитом и окрашенных EtBr и FITC-декстраном (16 и 13%) сразу после электропорации (таблица). Мы предполагаем, что электропорация клеток дрожжей после инкубации с глюкозой и 1 М сорбитом не приводит к формированию пор (или приводит к образованию очень небольшого числа пор). Снижение эффективности электропорации в присутствии осмолита, оцененное по накоплению красителя Tгуран Blue, было показано также и на животных клетках [43].

Накопление FITC-декстрана в клетках, электропорированных в сорбите, показывает другую динамику (рис. 1в, таблица). Присутствие 1 М сорбита во время электропорации вызывает очень небольшой прирост в количестве клеток, окрашенных FITC-декстраном. Прирост наблюдали как после инкубации с глюкозой, так и без нее (рис. 1в, кружки). Можно сказать, что действие сорбита (как и глюкозы) на формирование больших пор оказалось противоположным действием, которое он оказывал на формирование мелких пор (сравни рис. 1в и 2в). В качественном плане можно констатировать, что сорбит, как и глюкоза, подавляет образование мелких пор (через которые в клетку поступает EtBr), но стимулирует формирование больших (путь поступления FITC-декстрана) (таблица).

ВЫВОДЫ

15-минутная преинкубация клеток дрожжей *S. cerevisiae* SEY6210 оказывает существенное влияние на эффективность электропорации. Анализ окрашивания клеток красителями EtBr (молекулярный радиус 0,8 нм) и FITC-декстраном (молекулярный радиус 5,8 нм) позволяет предположить формирование двух типов пор: больших (не менее 5,8 нм) и мелких (меньше

1 нм). Инкубация с глюкозой в значительной степени подавляет формирование мелких электропор и слабо стимулирует образование больших. Эти эффекты усиливаются при наличии в среде преинкубации и порации 1 М сорбита. Кроме того, преинкубация с глюкозой и сорбитом приводит к спонтанному формированию пор в мембране даже без приложения электрического импульса.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. J. C. Weaver, IEEE Trans. on Dielectrics and Electrical Insulation **10** (5), 754 (2003)
2. Z. A. Levine and P. T. Vernier, J. Membr. Biol. **236** (1), 27 (2010)
3. E. Neumann and S. Kakorin, Technol. Cancer Res. Treat. **1** (5), 329 (2002)
4. G. Saulis, Biophys. J. **73** (3), 1299 (1997)
5. G. Saulis, Biomed. Sci. Instrum. **35**, 291 (1999)
6. G. Saulis and R. Saule, Biochim. Biophys. Acta **1818** (12), 3032 (2012)
7. K. C. Smith, R. S. Son, T. R. Gowrishankar, et al., Bioelectrochemistry **100**, 3 (2014)
8. J. C. Weaver, Methods Mol. Biol. **55**, 3 (1995)
9. J. C. Weaver, G. I. Harrison, J. G. Bliss, et al., FEBS Lett. **229** (1), 30 (1988)
10. S. Y. Ho and G. S. Mittal, Crit. Rev. Biotechnol. **16** (4), 349 (1996)
11. L. Aigrain, M. Sustarsic, R. Crawford, et al., J. Vis. Exp. (96), e52208 (2015)
12. V. Ganeva, B. Galutzov, and J. Teissie, Biochim. Biophys. Acta **1240** (2), 229 (1995)
13. S. Hojo, K. Shimizu, H. Yositate, et al., IEEE Trans. Nanobioscience **2** (1), 35 (2003)
14. J. M. Gancedo, FEMS Microbiol. Rev. **32**, 673 (2008)
15. R. Geladé, S. Van de Velde, P. V. Van Dijk, and J. M. Thevelein, Genome Biol. **4** (11), 233 (2003)
16. F. W. Rolland, J. Winderickx, and J. M. Thevelein, FEMS Yeast Res. **2**, 183 (2002)
17. Z. Yin, S. Wilson, N. C. Hauser, et al., Mol. Microbiol. **48** (3), 713 (2003)
18. R. Serrano, FEBS Lett. **156** (1), 11 (1983)
19. S. Permyakov, N. Suzina, and A. Valiakhmetov, PLoS One **7** (2), e30966 (2012)
20. R. Cadek, K. Chladkova, K. Sigler, et al., Biochim. Biophys. Acta **1665** (1–2), 111 (2004)
21. J. Severin, P. Langel, and M. Hofer, J. Bioenerg. Biomembr. **21** (3), 321 (1989)
22. A. K. Poulsen, A. Z. Andersen, J. C. Brasen, et al., Biochemistry **47** (28), 7477 (2008)
23. A. E. Sowers and M. R. Lieber, FEBS Lett. **205** (2), 179 (1986)
24. M. T. Muraji, W. Konishi, and T. Fujii, Bioelectrochem. Bioenerg. **31**, 77 (1993)
25. G. Saulis, Cell Mol. Biol. Lett. **10** (1), 23 (2005)

26. M. P. Rols, F. Dahhou, K. P. Mishra, et al., *Biochemistry* **29** (12), 2960 (1990)
27. V. Volkov, *Front Plant Sci.* **6**, 425 (2015)
28. A. Pena, N. S. Sanchez, and M. Calahorra, *J. Bioenerg. Biomembr.* **42** (5), 419 (2010)
29. E. Sayas, F. Garcia-Lopez, and R. Serrano, *Yeast* **32** (9), 595 (2015)
30. E. Kulakovskaya, B. Baskunov, and A. Zvonarev, *J. Oleo Sci.* **63** (7), 701 (2014)
31. A. A. Gurtovenko and I. Vattulainen, *J. Amer. Chem. Soc.* **127** (50), 17570 (2005)
32. L. V. Trilisenko, E. V. Kulakovskaya, T. V. Kulakovskaya, et al., *Springerplus* **1**, 18 (2012)
33. Y. Rosemberg and R. Korenstein, *Biophys. J.* **58** (4), 823 (1990)
34. G. Saulis, M. S. Venslauskas, and J. Naktinis, *J. Electroanal. Chem. and Interfacial Electrochem.* **321** (1), 1 (1991)
35. M. Muraji, W. Tatebe, T. Konishi, et al., *Bioelectrochem. Bioenerg.* **31** (1), 77 (1993)
36. P. A. Grigoriev and G. C. Holt, *J. Biol. Phys. Chem.* **15** (4), 181 (2015)
37. J. Malinsky, M. Opekarova, G. Grossmann, et al., *Annu. Rev. Plant Biol.* **64**, 501 (2013)
38. I. van Uitert, S. Le Gac, and A. van den Berg, *Biochim. Biophys. Acta* **1798** (1), 21 (2010)
39. I. Slaninova, S. Sestak, A. Svoboda, et al., *Arch. Microbiol.* **173** (4), 245 (2000)
40. M. R. da Silva Pedrini, S. Dupont, A. de Anchieta Camara, Jr., et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98** (3), 1271 (2014)
41. M. Suga, I. Kusanagi, and T. Hatakeyama, *FEMS Microbiol. Lett.* **225** (2), 235 (2003)
42. M. Suga, I. Kusanagi, and T. Hatakeyama, *Biotechniques* **36** (2), 218 (2004)
43. M. P. Rols and J. Teissie, *Biochemistry* **29** (19), 4561 (1990)

Effect of Glucose and Sorbitol on Pore Formation in the Plasma Membrane of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* during Electroporation

A.Ya. Valiakhmetov and A.O. Shepelyakovskaya

**Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms, Russian Academy of Sciences, prosp. Nauki 5, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

***Branch of Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, prosp. Nauki 6, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

The task of the research was to elucidate the influence of a short (15 min) preincubation of *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells with glucose on the process of pore formation during electroporation. Pore formation was assessed by internalization of two fluorescent dyes in the cells: ethidium bromide (a molecular radius of ~0.8 nm) and 70 kDa FITC-dextran (a molecular radius of ~5.8 nm). It has been shown that the preincubation with glucose decreases the number of cells internalizing ethidium bromide and increases the number of cells internalizing FITC-dextran. The observed effect is intensified in the medium with 1M sorbitol. It has been shown that the preincubation with glucose leads to a considerable increase in the internalizing of both dyes in the control cells not exposed to electroporation. It is concluded that preincubation with glucose affects both the total number and size of the formed pores.

Keywords: yeast, electroporation, pore formation during electroporation, glucose effect, FITC-dextran, membrane resealing