На правах рукописи

КОМАРОВА Анна Владимировна

РОЛЬ ИОННЫХ МЕХАНИЗМОВ И ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО ЛАТЕРАЛЬНОГО ТРАНСПОРТА В РЕГУЛЯЦИИ СВЕТОЗАВИСИМЫХ МЕМБРАННЫХ ПРОЦЕССОВ РАСТИТЕЛЬНОЙ КЛЕТКИ

03.01.02 – Биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва 2016

Работа выполнена на кафедре биофизики Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова».

Научный руководитель:

Булычев Александр Александрович

доктор биологических наук, профессор кафедры биофизики биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»

Официальные оппоненты:

Иванов Борис Николаевич

доктор биологических наук, заведующий лабораторией фотосинтетического электронного транспорта в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Институт фундаментальных проблем биологии Российской академии наук», г. Пущино

Трофимова Марина Сергеевна

доктор биологических наук, заведующий лабораторией мембран растительных клеток в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук», г. Москва

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биофизики клетки Российской академии наук», г. Пущино

Защита состоится «___» _____ 2016 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 501.001.96 при Московском государственном университете имени М. В. Ломоносова по адресу: 119234, Россия, Москва, Ленинские горы, д.1, стр. 24, МГУ, биологический факультет, кафедра биофизики, аудитория «Новая».

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова и на сайте: http://istina.msu.ru/media/dissertations/dissertation/d10/fe0/27489447/Komarova_disser.pdf

Автореферат разослан « ___ » _____ 2016 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук М.Г. Страховская

Общая характеристика работы

Актуальность проблемы

Механизмы внутриклеточной регуляции представляют одну из важных проблем биологии. В настоящее время установлена тесная связь фотобиологических и мембранных процессов, протекающих на уровне мембран хлоропластов при фотосинтезе; показана ключевая роль потоков H^+ и других ионов между тилакоидами и стромой в регуляции фотохимического использования световой энергии, электронного транспорта и темновых ферментативных реакций. Нарастает число сведений о тесном сопряжении фотосинтетического метаболизма с дыхательной активностью митохондрий. Вместе с тем, регуляторные связи, опосредованные взаимодействием хлоропластов с транспортными системами плазматических мембран, другими близлежащими и удаленными органеллами, остаются во многом не раскрытыми. Выяснение механизмов и функциональной роли таких взаимодействий представляет одну из центральных проблем биофизики клетки.

Ярким примером внутриклеточной регуляции являются обратимые переходы между однородным и неоднородным распределением фотосинтетической активности и потоков протонов в клетках харовых водорослей, длина которых может достигать 10-15 см. Природа этого явления во многом еще неясна, но известно, что участки с низкой активностью фотосистемы II (ФСII) лежат в зонах поглощения протонов, где pH на поверхности почти на 3 ед. выше, чем в зонах с активным фотосинтезом (Bulychev *et al.* 2001; Krupenina and Bulychev 2007). Координацию профилей фотосинтеза и наружного pH объясняют разной доступностью субстрата фотосинтеза – молекул CO_2 при высоких и низких pH среды (Walker *et al.* 1980; Lucas *et al.* 1983). Вместе с тем, неоднородные профили могут контролироваться и другими факторами. Образование щелочных зон может происходить не только в интактной клетке. Японские авторы наблюдали образование на свету щелочных зон в поврежденных прозрачных участках клетки, из которых хлоропласты были механически вытеснены (Shimmen and Yamamoto 2002). Возникновение потоков H^+ через плазмалемму при воздействиях разной природы (свет, удаление хлоропластов) поднимает вопрос о взаимной связи клеточных процессов, индуцируемых светом и микроповреждением в фотосинтезирующих клетках. Механизмы, связывающие фотосинтез и мембранный транспорт при микроповреждениях клеточной стенки и их репарации, в настоящее время остаются невыясненными.

Координация метаболической активности участков клетки, разделенных большими расстояниями, может осуществляться за счет переноса веществ с потоком цитоплазмы (циклоз). Возможность переноса метаболитов и мессенджеров с потоком цитоплазмы признана на общем уровне, однако, конкретные сведения о функциональных проявлениях такого транспорта и переносимых компонентах крайне ограничены. Наряду с распределением веществ по объему клетки и выравниванием внутриклеточных градиентов, движение жидкости выполняет другие важные функции. Поток жидкости ускоряет обмен метаболитов между цитоплазмой и неподвижными органеллами, способствует возникновению неравновесных структур. Клеточные процессы, связанные с течением цитоплазмы, необходимо исследовать в условиях неравномерного воздействия физических факторов на разные части клетки. Важным примером является неравномерное освещение, имитирующее мозаичное быстро меняющееся освещение объекта в природных условиях. При равномерном освещении, когда все части клетки функционируют сходным образом, внутриклеточные градиенты не возникают, и эффекты, связанные с латеральным переносом, остаются скрытыми.

Данная работа направлена на выяснение роли циклоза и латерального транспорта в дальней сигнализации, участвующей в регуляции фотосинтеза и трансмембранных потоков H^+ плазмалеммы и хлоропластов. Решение этой проблемы на модельном объекте – харовых водорослях, позволит расширить современные знания о регуляции фотобиологических и мембранных процессов растительной клетки.

Цель и задачи исследования

В связи с вышесказанным целью данной работы стало изучение механизмов внутриклеточной регуляции на примере светозависимых и мембранных процессов растительной клетки, таких как транспорт H^+, индуцированный светом и механическим воздействием; фотохимическая активность фотосистемы II и дальние внутриклеточные взаимодействия.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

• Изучить ранние физико-химические процессы при микроперфорации клеточной стенки (КС) междоузлий *Chara corallina*, установить основные компоненты ответа на механическое повреждение, прояснить роль движения цитоплазмы и хлоропластов в механизмах, запускаемых при микроповреждении КС.

• Изучить влияние локального освещения удаленного участка клетки *Chara corallina* на уровень фактической флуоресценции хлоропластов (*F'*); установить роль движения

цитоплазмы и его кратковременной остановки в транспорте фотосинтетически активных интермедиатов.

• Изучить связь дистанционных взаимодействий между хлоропластами, а также между хлоропластами и плазмалеммой с начальными стадиями репарации микроповреждений клеточной стенки.

Научная новизна

Впервые установлено, что локальное защелачивание снаружи клетки служит важным элементом ответной реакции клеток *Chara corallina* на механический стресс. Существенную роль в развитии pH ответа при микроперфорации клеточной стенки играют растяжение плазматической мембраны, активация механочувствительных Ca^{2+}-проводящих каналов и лабильность цитоскелета. Размер механоиндуцированной щелочной зоны определяется в основном диффузией высвобождаемого в цитозоле компонента и частично циклозом.

Показано, что поток цитоплазмы играет ключевую роль в дальних взаимодействиях между хлоропластами. Распространение фотосинтетически активного интермедиата из зоны яркого освещения с потоком жидкости вызывает изменения фактической флуоресценции хлоропластов (F') в затененной части клетки на расстояниях до 5 мм от места воздействия. Впервые обнаружено, что передача сигнала с потоком цитоплазмы подавляется после темновой адаптации и зависит от переноса электронов в акцепторной части фотосистемы I (ФСI). Установлено, что резкая остановка циклоза по-разному искажает симметрию волны изменений флуоресценции хлорофилла в случаях, когда сигнальный агент достиг или не достиг зоны измерения F' в момент остановки.

Научно – практическая ценность работы

Результаты диссертации расширяют представления о механизмах регуляции светозависимых и мембранных процессов растительной клетки, о дальних внутриклеточных взаимодействиях в растительных клетках, а также о регуляторной и защитной роли движения цитоплазмы. Полученные результаты имеют важное научно-практическое значение для понимания механизмов восприятия неблагоприятных механических воздействий, а также запускаемых сигнальных каскадов, что позволит выявить основы устойчивости клеток к механическому стрессу. Детальное понимание таких механизмов является необходимым условием для разработки методов направленного повышения устойчивости сельскохозяйственных растений.

Личный вклад соискателя

Все представленные в диссертации данные получены лично автором или при его непосредственном участии. Автор участвовал в обосновании и постановке основной части экспериментов, а также в обобщении и интерпретации результатов. Текст диссертации написан автором по плану, согласованному с научным руководителем.

Апробация работы

Результаты работы были представлены в виде устных и стендовых докладов на российских и международных конференциях: с XIX по XXIII международных конференциях «Математика. Компьютер. Образование», Дубна 2012, 2014, 2016, Пущино 2013, 2015; XIX, XX и XXIII международных научных конференциях студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов», Москва, 2012, 2013, 2016; международной конференции "Photosynthesis Research for Sustainability, Пущино, 2014; 12-ой международной летней школе по биофизике «Biomolecular complexes and assemblies», Примоштен, Хорватия, 2014; XXI Пущинских чтениях по фотосинтезу, Пущино, 2015; 10-ом Европейском биофизическом конгрессе, Дрезден, 2015; VIII Съезде общества физиологов растений России, Петрозаводск, 2015; V Съезде биофизиков России, Ростов-на-Дону, 2015; 1-ой международной конференции для молодых ученых «Biophysics, Biophotonics, Biotechnology», Москва, 2016; 4-ом международном симпозиуме «Plant Signaling and Behavior», Санкт-Петербург, 2016; научной конференции с международным участием и школе молодых ученых «Сигнальные системы растений: от рецептора до ответной реакции организма», Санкт-Петербург, 2016; а также на научных семинарах кафедры биофизики биологического факультета МГУ и кафедре нелинейных систем университета Отто-фон-Герике (Магдебург, Германия).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 32 работы, из них 10 статей в отечественных и зарубежных журналах.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 129 страницах машинописного текста; состоит из введения, обзора литературы, методической части, результатов, обсуждения, выводов и списка литературы. Диссертация включает 1 таблицу и 38 рисунков. Список литературы содержит 177 источников.

Материалы и методы

В опытах использовали изолированные клетки междоузлий харовой водоросли *Chara corallina* Klein ex Willd. длиной ~6-8 см и диаметром 1 мм, которые помещали в искусственную прудовую воду (ИПВ), содержащую 0.1 мМ KCl, 1.0 мМ NaCl и 0.1 мМ $CaCl_2$. Измерения проводили на базе инвертированного микроскопа Axiovert 25-CFL (Zeiss, Германия). В работе использовано сочетание микрометодов (рис. 1), таких как измерения pH у поверхности клетки (в апопласте, pH_o) с помощью pH-чувствительных микроэлектродов, измерения флуоресценции хлорофилла на микроучастках клетки флуориметром Microscopy-PAM (Walz), механическая стимуляция с помощью микроигл (стеклянных микропипеток с диаметром кончика ~1 мкм), локальное освещение участка клетки через торец тонкого (400 мкм) оптоволокна, позиционируемого на заданном расстоянии от места измерения с помощью микрометрической подачи.

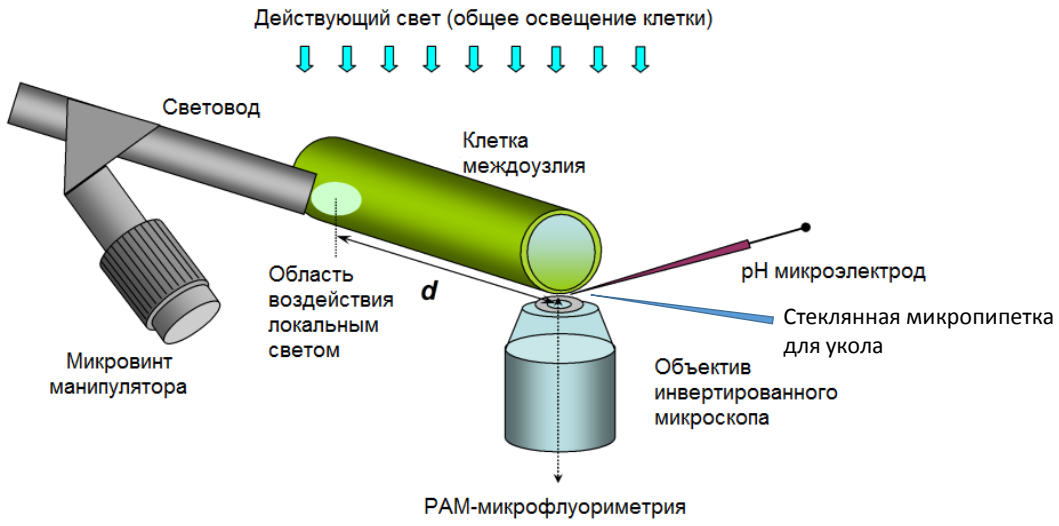

Рис. 1. Схема установки для измерения флуоресценции хлоропластов и pH у поверхности клетки (pH_o) при механической и локальной световой стимуляции. Стеклянная микропипетка с диаметром кончика ~1 мкм служила для короткого укола клетки. С противоположной стороны подводили оплавленный капилляр для создания опоры во время укола (на рис. не показан). Локальный свет направляли на клетку с помощью тонкого световода, расположенного на расстоянии d от места измерения флуоресценции и pH_o. Это расстояние варьировали за счет смещения оптоволокна с помощью микровинта манипулятора.

Содержание работы

Роль ионных механизмов и латерального транспорта в ответе растительной клетки на механический стресс

При механической стимуляции клеток использовали три микроманипулятора: для точного позиционирования pH-микроэлектрода, укалывающей микроиглы, а также оплавленного капилляра (внешний диаметр 1 мм), служащего в качестве опоры для клетки в месте укола. Стимулирующую микропипетку вводили в клетку на глубину нескольких микрометров и через 1-2 с отводили.

Впервые установлено, что микроукол КС междоузлия *Chara* без попадания кончика пипетки в цитоплазму вызывает быстрое локальное повышение pH у поверхности клетки (pH_o) на 2–3 ед. после лаг периода 10–20 с (рис. 2А). Изменения pH_o обратимы; период восстановления pH занимает ~40 мин.

Для выяснения топографии щелочной зоны, образующейся при микроперфорации КС, были измерены сдвиги pH_o на разных расстояниях от точки микроукола. Наружные щелочные зоны, возникающие при микроперфорации КС, имеют размер ~100 мкм, что на порядок меньше ширины обычных светозависимых щелочных полос (рис. 2Б).

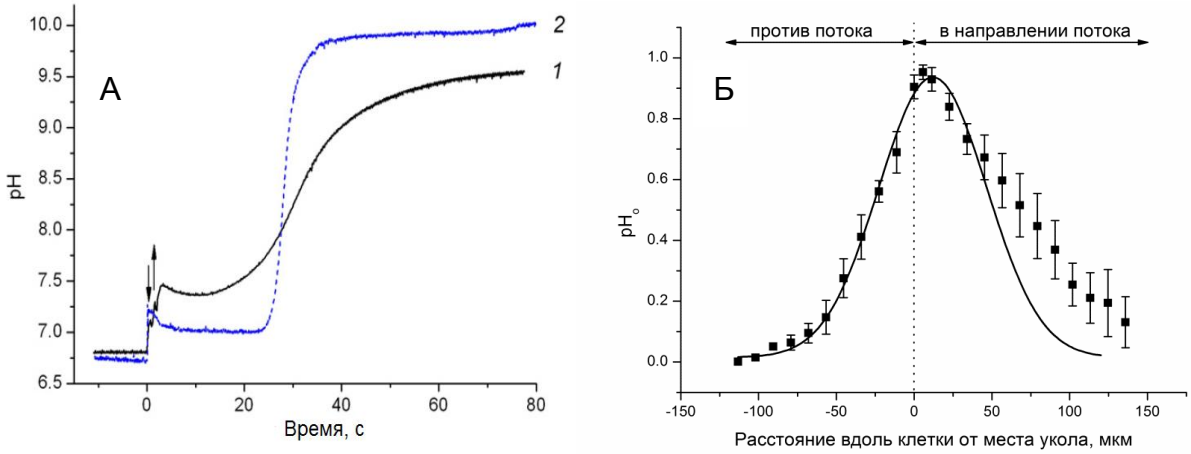

Рис. 2. (А) Локальные изменения pH у поверхности освещенных интернодальных клеток *Chara corallina* после микроперфорации клеточной стенки (КС) стеклянной микропипеткой. Показана быстрая стадия ответа pH_o. 1 и 2 — pH ответы разных клеток. Нулевой момент времени (t = 0) на этом и последующих рисунках соответствует моменту микроперфорации КС. (Б) Асимметричный аксиальный профиль pH_o в области микроперфорации клеточной стенки *C. corallina*. Экспериментальные данные (символы) изображают профиль стационарного распределения pH в сравнении с гауссовой кривой нормального распределения (линия), рассчитанной в предположении о симметричной форме распределения pH в направлении потока и против потока цитоплазмы.

Установлено, что зона наружного защелачивания на поверхности клетки в области микроукола асимметрична относительно точки приложения механостимула и простирается в направлении движения цитоплазмы. Это означает, что поток слегка способствует распространению в цитозоле компонента, вызывающего активацию транспорта H^+ через плазматическую мембрану. Анализ кинетических кривых возрастания pH_o на разных расстояниях от точки укола говорит о том, что эффективный коэффициент диффузии интермедиата, участвующего в активации входящего потока H^+ при микроуколе, составляет ~10^{-7} $см^2/с$, т.е. соответствует коэффициенту диффузии Ca^{2+} в цитоплазме.

Сдвиги pH_o в ответ на перфорацию КС постепенно исчезали после выключения света, а также на свету в присутствии диурона (рис. 3). Переносчики электронов, расположенные между ФСII и ФСI, в обработанных диуроном клетках преимущественно окислены на свету за счет работы ФСI. В темноте они частично восстанавливаются за счет хлородыхания (Nixon 2000). Сделан вывод, что щелочной сдвиг pH в ответ на механическую стимуляцию зависит от редокс состояния электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) фотосинтеза.

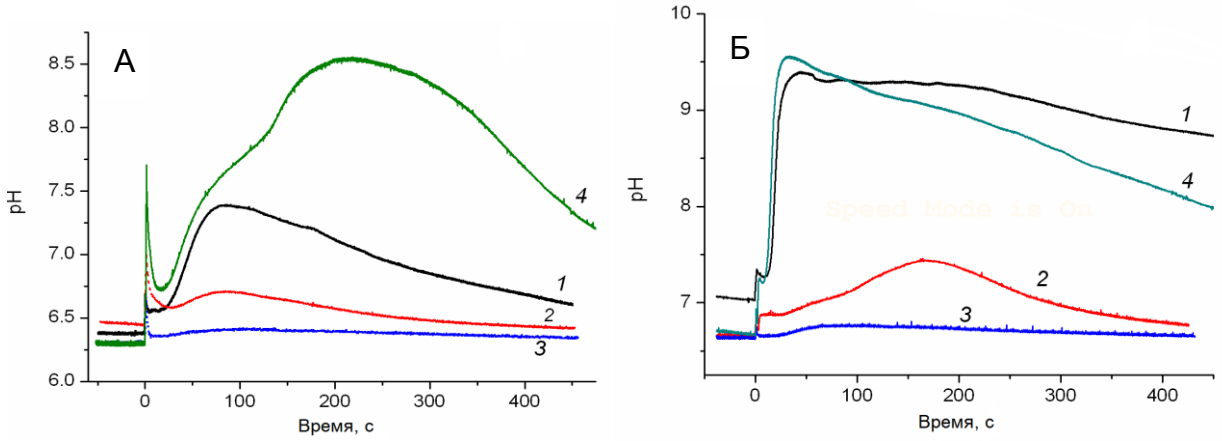

Рис. 3. Зависимость изменений pH_o, вызванных микроперфорацией КС, от условий освещения и состояния фотосинтетической цепи. (А) Постепенное исчезновение щелочного ответа на микроповреждение КС в течение темновой адаптации различной длительности: 1 – 45 мин, 2 – 60 мин, 3 – 90 мин. Кривая 4 отражает восстановление отклика pH_o через 2 мин после включения действующего света (интенсивность 100 мкмоль/($м^2$ с)). (Б) Обратимое подавление ответа на микроповреждение КС в присутствии 4 мкМ диурона, ингибитора фотосинтетического электронного транспорта: 1 – в отсутствии ингибитора, 2, 3 – после 5 и 20 мин инкубации с 4 мкМ диуроном, 4 – спустя 20 мин после начала отмыва клетки в ИПВ. Интенсивность действующего света 28 мкмоль/($м^2$ с).

Выявлено участие потока цитоплазмы в образовании щелочной зоны на поверхности клетки *Chara* при микроперфорации мембраны вакуоли (тонопласта). Уколы КС без попадания или с попаданием микроиглы в цитоплазму вызывали одинаково быстрые изменения pH_o, а прокол вакуолярной мембраны, сопровождаемый генерацией потенциала действия (ПД), вызывал образование щелочной зоны с длительной (30–100 с) задержкой от момента укола (рис. 4А). Установлено, что генерация ПД при прокалывании тонопласта сопровождается повышением pH в вакуоле в связи с локальной утечкой H^+ в цитоплазму. Снижение $pH_{цит}$ (по оценкам до pH ~5.2) устраняет движущую силу для потока H^+ из среды в цитоплазму, препятствуя образованию наружной щелочной зоны. Движущая сила для потока H^+ из среды в цитоплазму восстанавливается при возобновлении циклоза, когда поток уносит «кислую» цитоплазму из зоны перфорации. Об этом говорит прямая корреляция между временем задержки образования щелочной зоны в области микроукола и длительностью остановки циклоза после прокалывания тонопласта (рис. 4Б).

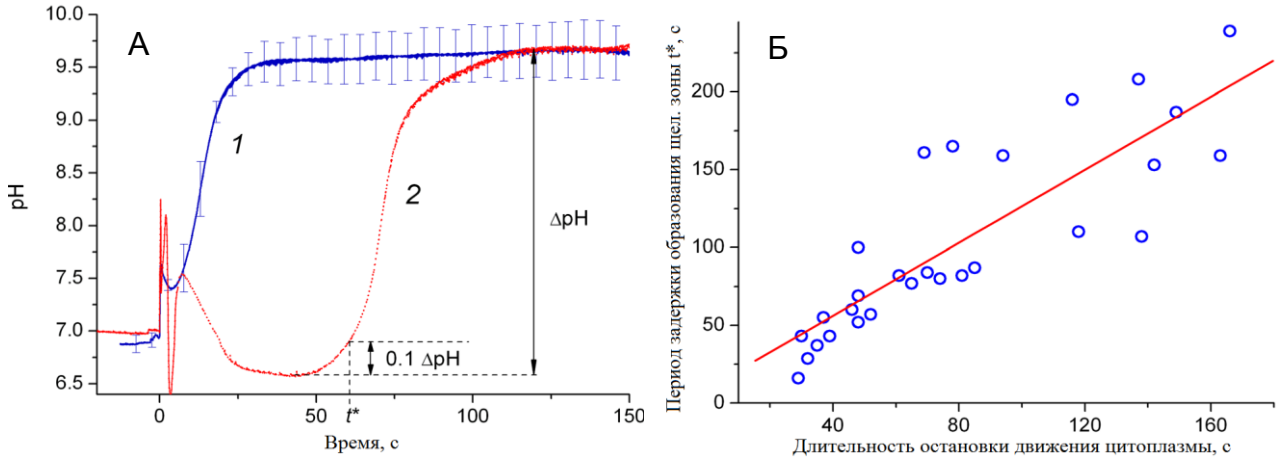

Рис. 4. Изменения pH у поверхности (pH_o) интернодальных клеток *Chara corallina*, вызванные микроперфорацией КС: 1 – при введении микропипетки в цитоплазму, 2 – при введении микропипетки в вакуоль, сопровождаемом генерацией ПД. Пунктирные линии показывают способ расчета периода *t**, характеризующего начало образования щелочной зоны. (Б) Корреляция между длительностью остановки движения цитоплазмы и периодом задержки образования щелочной зоны (время *t**) после прокола тонопласта и возбуждения клетки. Прямая линия аппроксимирует результаты экспериментов, полученных на 8 клетках.

Сдвиги pH_o в ответ на укол КС ослабляются при повышении осмотического давления среды (50 мМ сорбит) и восстанавливаются при переносе клетки в исходный раствор (рис. 5А). Согласно предложенной схеме, тургорное давление вдавливает плазмалемму в микродефект КС, что вызывает растяжение мембраны в зоне дефекта,

активацию механочувствительных каналов и, в конечном итоге, – повышение pH_o. Возрастание pH_o в ответ на микроукол подавлялось в присутствии ингибиторов Ca^{2+}-каналов (La^{3+}, Gd^{3+} (рис. 5Б), Zn^{2+}) и усиливалось при повышении наружной концентрации Ca^{2+} от 0.1 до 1.0 мМ (рис. 5В), а также после предварительного возбуждения клетки, которое резко повышает уровень Ca^{2+} в цитоплазме (Berestovsky and Kataev 2005; Hepler 2005). Полученные данные указывает на участие ионов Ca^{2+} в активации входящего потока H^+, запускаемого механическим стрессом.

Показано, что в присутствии ингибиторов, повреждающих микротрубочки (МТ), – оризалина (деполимеризует МТ, рис. 5Г) и таксола (стабилизирует МТ) – щелочная зона при микроповреждении не образуется. Полученные результаты позволяют сделать вывод, что цитоскелет принимает участие в первичных стадиях развития ответа на механический стресс.

Вопрос о природе щелочных сдвигов pH при микроперфорации и роли хлоропластов в этом процессе представляется особенно важным в связи со способностью харовых водорослей генерировать на свету перемежающиеся кислые и щелочные зоны. Возникновение этих зон отражает неравномерное пространственное распределение активных H^+АТФаз и H^+/OH^-проводящих каналов (Lucas and Nuccitelli 1980; Schmölzer *et al.* 2011; Beilby and Bisson 2012; Bulychev 2012). Поскольку щелочные зоны образуются как при освещении, так и при микроперфорации, возникает вопрос о том, активируют ли свет и микроповреждение КС одни и те же или же различные H^+транспортирующие системы.

Щелочные зоны, образуемые в норме на свету и при микроперфорации КС, резко отличаются по чувствительности к ингибитору полимеризации микротрубочек оризалину. В концентрации 1–5 мкМ оризалин устраняет ответную реакцию на механический стимул (рис. 5Г), но не снижает способности клеток формировать щелочные зоны при освещении (Sommer *et al.* 2015).

Другое яркое отличие состоит в том, что генерация потенциала действия вызывает временную инактивацию H^+-проводимости и исчезновение щелочных зон, формируемых на свету. После электрической стимуляции клеток светозависимый профиль pH_o выравнивается (Krupenina *et al.* 2008). В отличие от этого, предварительное возбуждение усиливает образование щелочных зон при микроперфорации клетки (данные не показаны).

Таким образом, несмотря на сходство предельных значений pH_o (~10 ед.), создаваемых освещением и микроповреждением КС, входящие потоки H^+ через плазмалемму в случаях фото- и механостимуляции по-видимому опосредованы различными H^+ -проводящими системами.

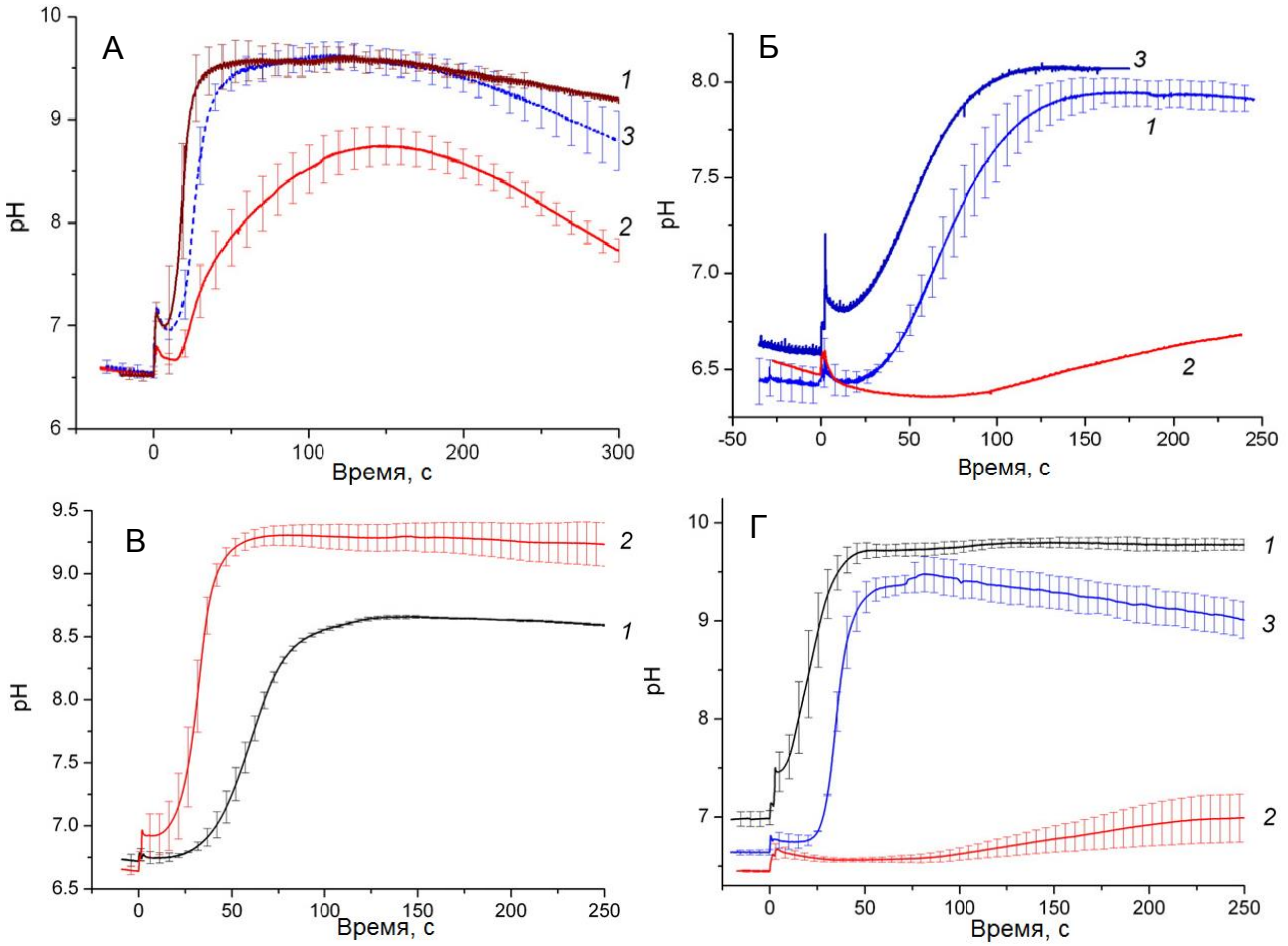

Рис. 5. (А) Влияние изменения осмолярности омывающего клетки раствора на сдвиги pH_o, вызванные микроперфорацией КС. В ходе эксперимента искусственную прудовую воду (ИПВ) заменяли на ИПВ с добавлением 50 мМ сорбита, а затем снова на стандартный раствор ИПВ. 1 – контроль, 2 – в присутствии 50 мМ сорбита, 3 – после отмывки клетки в ИПВ. (Б) Обратимое ингибирующее действие 10 мкМ Gd^{3+} (блокатор Ca^{2+}-каналов, активируемых при натяжении (Kaneko *et al.* 2005)): 1 – в отсутствии ингибитора, 2 – в присутствии 10 мкМ Gd^{3+}, 3 – после отмывки клетки в ИПВ. (В) Усиление щелочного сдвига при механическом стрессе после замены 0.1 мМ $CaCl_2$ в среде на 1 мМ $CaCl_2$. 1 – 0.1 мМ Ca^{2+}, 2 – 1.0 мМ Ca^{2+}. (Г) Влияние оризалина (1 мкМ) на защелачивание снаружи клетки (pH_o) при микроперфорации КС. (А) 1 – контроль, 2 – после 40-120 мин инкубации с оризалином, 3 – после отмывки клетки в ИПВ в течение 20-40 мин.

Дальние взаимодействия хлоропластов, опосредованные латеральным транспортом молекул с потоком цитоплазмы

Для изучения дальней сигнализации в междоузлиях харовых водорослей был использован оригинальный подход. Клетку освещали локально через узкое (0.4 мм) оптическое волокно на разном удалении (1–5 мм) от места измерения флуоресценции и внеклеточного pH (рис. 6). При этом исследуемый микроучасток диаметром ~100 мкм находился в условиях постоянного фонового освещения заданной слабой или умеренной интенсивности. Хлоропласты, попадающие в зону интенсивного локального освещения, модифицируют состав текущей цитоплазмы за счет обмена компонентов через оболочку пластид. Лабильные компоненты цитоплазмы выступают в роли движущихся по течению сигналов, которые вызывают ответные реакции плазмалеммы и хлоропластов в зоне измерения. Флуоресценция хлорофилла служит чувствительным показателем этих изменений.

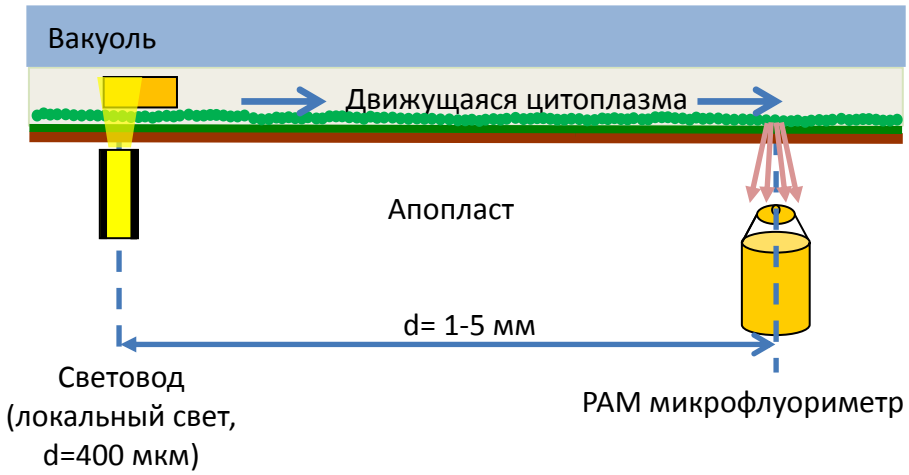

Рис. 6. Схема опытов с локальной фотостимуляцией удаленного участка клетки. Световод освещает небольшой участок на нижней стороне клетки; в период освещения порция цитоплазмы, показанная желтым прямоугольником, модифицируется за счет обмена с освещенными хлоропластами и увеличивается в размерах из-за смещения с потоком. После выключения локального света сформировавшийся в цитоплазме участок с модифицированным составом продолжает свое движение вдоль клетки в сторону области измерения флуоресценции. Когда модифицированная цитоплазма достигает и проходит область измерения, транспортируемый метаболит поступает в хлоропласты и вызывает изменения флуоресценции хлорофилла, измеряемые с помощью PAM-микрофлуориметрии.

Установлено, что яркий импульс локального освещения (ЛС, белый свет, 500 мкмоль/(м^2 с), диаметр светового пятна 400 мкм, длительность 30–50 с) вызывает распространение по клетке волны возрастания фактической флуоресценции

хлорофилла *F'* (с амплитудой до 50% от исходного уровня), направление движения которой совпадает с вектором течения цитоплазмы в плоскости измерения (рис. 7). При измерении в областях, лежащих выше по ходу движения цитоплазмы от световода, изменений *F'* в ответ на локальный фотостимул выявлено не было. Изменение флуоресценции *F'* вдали от места приложения фотостимула отражает временное восстановление акцептора Q_A и переносчиков электронов на участке между двумя фотосистемами при постоянной интенсивности освещения. Форма сигнала флуоресценции при равномерном движении цитоплазмы аппроксимируется гауссовой кривой. Полученные данные свидетельствуют о том, что компоненты, выделяемые хлоропластами в зоне интенсивного локального освещения, перемещаются с потоком цитоплазмы, проходят через зону измерения и изменяют редокс состояние стромы пластид в зоне затенения. В роли таких компонентов могут выступать восстановительные эквиваленты, экспортируемые из ярко освещенных хлоропластов.

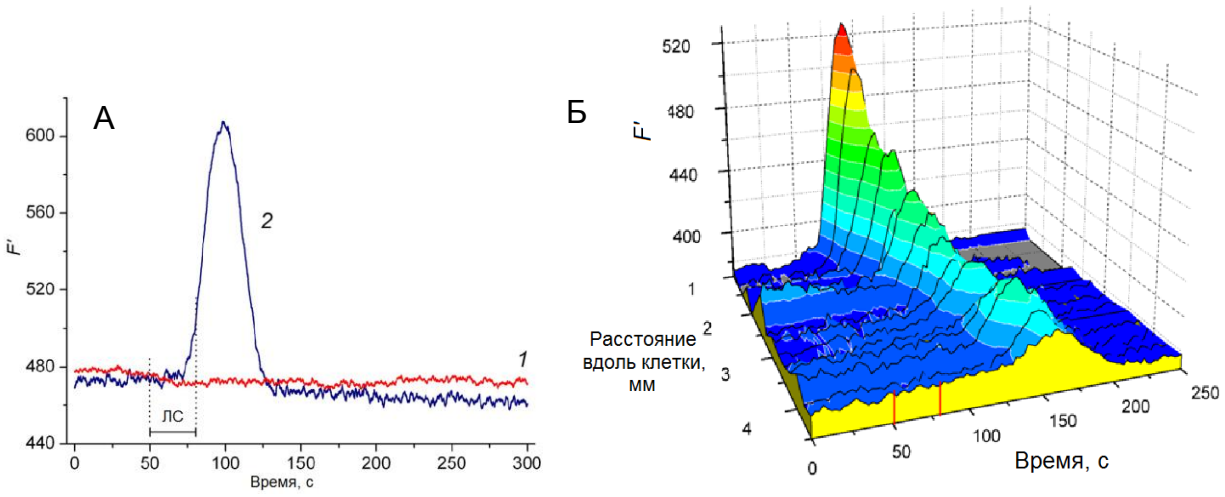

Рис. 7. (А) Профили изменений флуоресценции *F'* на микроучастках междоузлия *C. corallina*, отражающие распространение фотоиндуцированного сигнала в потоке цитоплазмы. Расстояние между зоной измерения и зоной локальной фотостимуляции (локальный свет (ЛС), белый свет, 500 мкмоль/(м^2 с)) — 1.5 мм. 1 – при расположении световода ниже по течению цитоплазмы от места регистрации флуоресценции хлоропластов, 2 – при расположении световода выше по ходу движения цитоплазмы от анализируемой области. 30-секундный импульс ЛС был включен при t = 50 с. На этом следующих рисунках пунктирные линии и отрезок между ними отражают время действия локального фотостимула. (Б) Волнообразное распространение изменений *F'* вдоль клетки в ответ на локальный фотостимул. 30-секундная локальная фотостимуляция осуществлялась при t = 50 с, этот временной интервал отмечен линиями. Интенсивность действующего света для рис. (А) и (Б) 9 мкмоль/(м^2 с).

Показано, что образование или восприятие метаболического сигнала в идентичных световых условиях практически полностью устраняются на период 60 с после предварительной адаптации клетки к темноте, несмотря на высокую скорость движения цитоплазмы (рис. 8А). Изменения *F'*, опосредованные удаленным локальным освещением клетки, возникали лишь спустя несколько минут после включения действующего света (рис. 8Б и 8В). Полному восстановлению латеральной передачи сигнала предшествует переходный пик на индукционной кривой флуоресценции на временах ~250 с после включения слабого фонового освещения, который проявлялся и в отсутствии локальной фотостимуляции. Таким образом, при изучении передачи фотосинтетически активных сигналов с потоком цитоплазмы в клетках *Chara* обнаружено явление фотоиндукции дальней сигнализации. Фотоиндукция передачи сигналов по длине клетки аналогична явлению индукции фотосинтеза, которое проявляется в длительной задержке начала фиксации CO_2 по сравнению с запуском фотосинтетического потока электронов и выделения O_2. Эти данные свидетельствуют о возможной роли фотоактивируемых ферментов, таких как ферредоксин-НАДФ$^+$ редуктаза (ФНР) или ферменты цикла Кальвина, в дальних взаимодействиях между хлоропластами.

Показано, что опосредованные циклозом изменения флуоресценции в ответ на локальное освещение удаленного участка необратимо подавляются ингибитором флавиновых ферментов дифениленодониумом (DPI), действующим на ферредоксин-НАДФ$^+$ редуктазу (ФНР) и НАД(Ф)Н-пластохинон редуктазу (рис. 8Г). Результаты указывают на важную роль DPI-чувствительных активируемых светом ферментов в дальней передаче внутриклеточных сообщений. При подавлении ФНР ингибитором DPI не происходит накопления НАДФН в строме ярко освещенных хлоропластов, что нарушает редокс обмен между стромой и цитозолем. В работе также установлено, что переходное возрастание флуоресценции *F'*, опосредованное переносом в жидком потоке восстановленных субстратов и восстановлением акцептора Q_A в ФСII, исчезает при переключении потока электронов с CO_2-зависимого пути на катализируемое метилвиологеном восстановление O_2 (данные не показаны). Полученные результаты говорят о важной роли реакций на акцепторной стороне ФСI в механизме дальней внутриклеточной сигнализации.

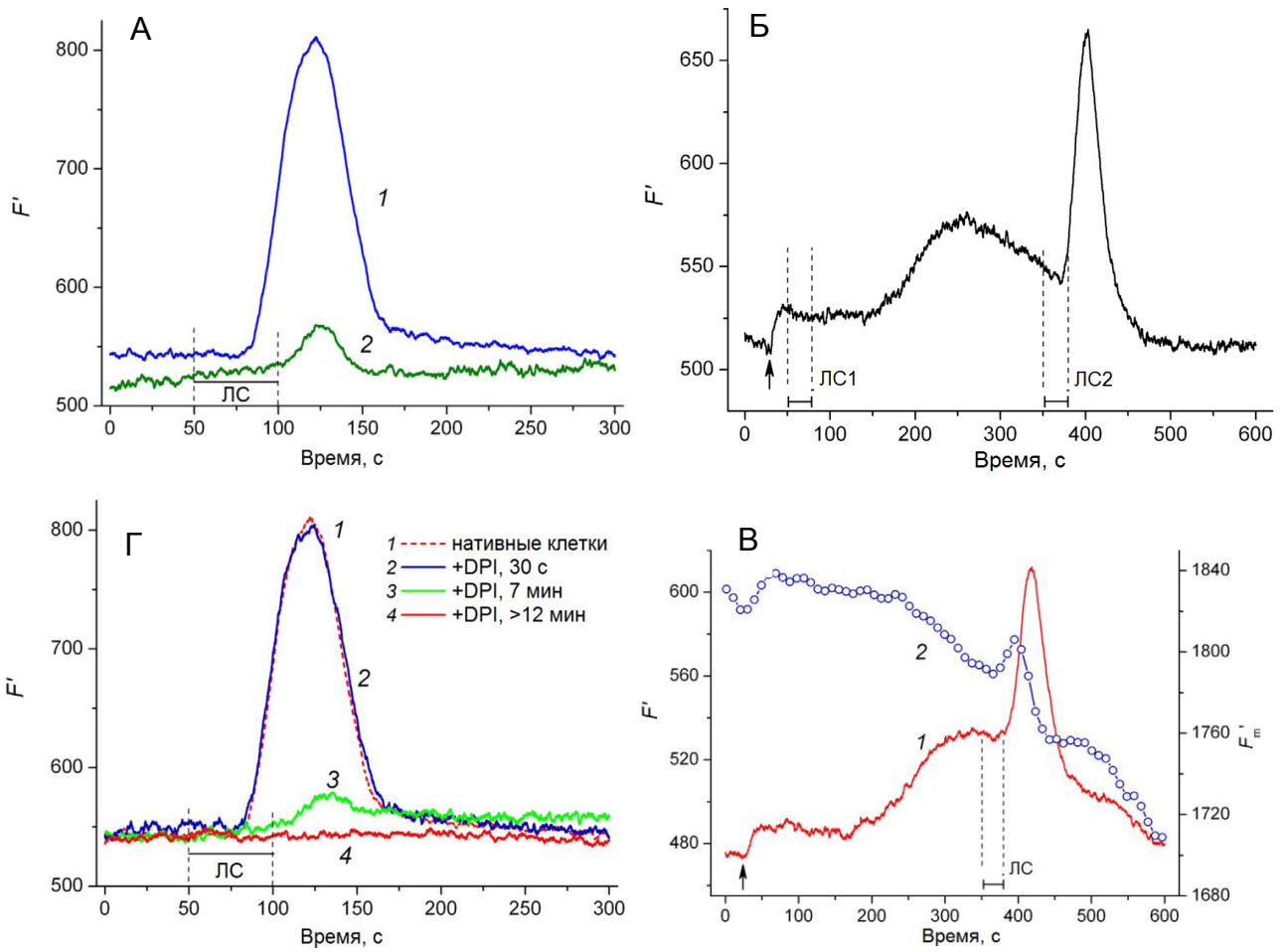

Рис. 8. (А) Изменения *F′* в ответ на локальную фотостимуляцию удаленного участка клетки (d = 1.5 мм) при интенсивности действующего света 9 мкмоль/(м^2 с) в контрольных условиях (кривая 1) и при той же интенсивности действующего света после предварительной темновой адаптации в течении 4 мин (кривая 2). (Б) Отсутствие ответа *F′* на первый 30-секундный импульс локального света (ЛС1) после 5-минутной темновой адаптации и развитие нормального ответа по флуоресценции на второй идентичный фотостимул (ЛС2) спустя 5.5 мин после включения действующего света. (В) Фотоиндукция на действующем свету ответа *F′*, опосредованного передачей сигнала с потоком цитоплазмы, не зависит от предварительного освещения локальным светом. Кривая 2 (круглые символы) изображает изменения максимальной флуоресценции F_m'. Клетку освещали одним локальным фотостимулом (ЛС) спустя 5.5 мин после включения действующего света. (Г) Подавление изменений *F′* в ответ на локальный фотостимул после добавления 10 мкМ DPI: 1 – нативные клетки (контроль), 2, 3, 4 – спустя 30 с, 7 и ≥12 мин после добавления 10 мкМ DPI.

Латеральный транспорт с потоком цитоплазмы можно остановить или замедлить под действием ингибитора актина (цитохалазин D) или за счет временной остановки при возбуждении клетки. Показано, что чем больше расстояние между источником локального света и местом измерения флуоресценции хлоропластов, тем дольше период задержки ответа *F′*, меньше амплитуда пика *F′* и шире полоса изменений

флуоресценции (рис. 9А). При подавлении потока цитоплазмы с помощью ингибитора актиновых филаментов (цитохалазин D) (рис. 9Б) наблюдали схожие изменения формы ответов *F'*, опосредованных локальной фотостимуляцией удаленного участка клетки. В случае сравнительно высокой скорости течения цитоплазмы конвекция служит основным механизмом транспорта фотосинтетически активного метаболита, а диффузия участвует только в уширении сигнала флуоресценции и не оказывает влияние на положение центра ответа *F'*, которое определяется конвекционным потоком.

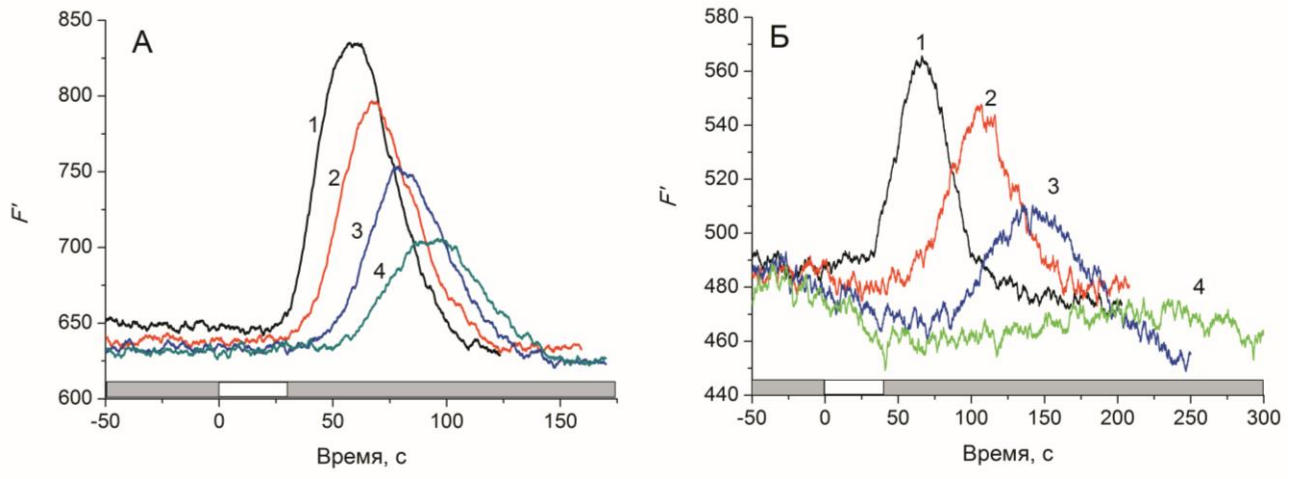

Рис. 9. (А) Изменения фактической флуоресценции хлоропластов *F'*, вызванные локальной световой стимуляцией удаленного участка клетки при измерениях на расстоянии d 1, 1.5, 2, и 2.5 мм вниз по течению цитоплазмы от места фотостимуляции (кривые 1–4, соответственно). Клетки находились в условиях слабого измерительного света (8 мкмоль/(м^2 с), $\lambda < 580$ нм). Белый прямоугольник на оси абсцисс на этом и последующих рисунках отражает период действия ЛС. (Б) Изменения ответа *F'* на фиксированном расстоянии (1.5 мм) от места приложения локального фотостимула при постепенном уменьшении скорости потока цитоплазмы под действием цитохалазина D. Замедление цитоплазматического потока при инкубации клеток *C. corallina* в присутствии 10 мкм цитохалазина D сопровождалось увеличением времени достижения пика *F'* и уширением полосы изменений *F'*. Кривые 1–4 получены при скоростях циклоза 86, 30, 17 и 9 мкм/с, соответственно.

Выявлены закономерные модификации опосредованных циклозом изменений флуоресценции *F'* в клетках *Chara* под влиянием кратковременной остановки движения цитоплазмы. При стационарном потоке цитоплазмы изменения *F'*, вызванные ярким 30-секундным освещением удаленного участка клетки, имеют форму гауссовой кривой с симметричными фронтами нарастания и спада свечения. Временная остановка движения цитоплазмы после генерации потенциала действия

(ПД) вызывала затягивание переднего или заднего фронта волны изменений *F'* в зависимости от места локализации переносимого в потоке интермедиата по отношению к зоне измерения на момент возникновения ПД (рис. 10). Данные о распространении и профилях распределения фотосинтетически активного фактора по длине междоузлия *Chara* воспроизведены в первом приближении на основе математической модели с учетом диффузии и гидродинамического потока.

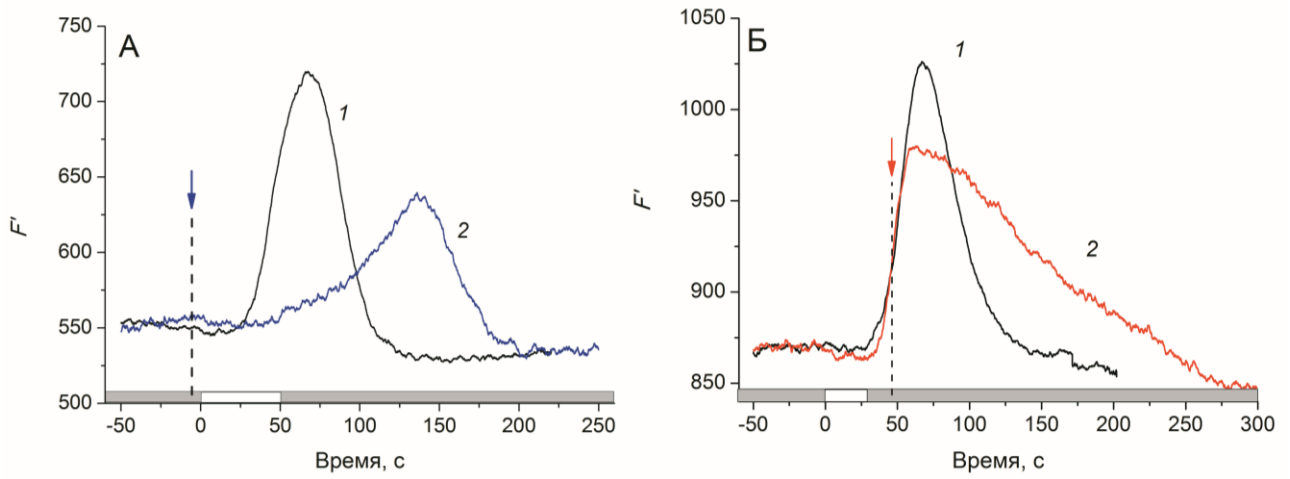

Рис. 10. Влияние временной остановки движения цитоплазмы на опосредованные циклозом изменения фактической флуоресценции *F'*. Изменения флуоресценции в ответ на удаленную локальную фотостимуляцию клетки в условиях нормального циклоза (кривые 1) и в тех же клетках после временной остановки потока в различные моменты времени до и после включения ЛС (кривые 2). Направленные вниз стрелки отмечают момент возбуждения клетки электрическим импульсом, что приводило к остановке циклоза на ~30 с с последующим медленным восстановлением скорости течения цитоплазмы.

Роль дистанционных взаимодействий между хлоропластами при микроповреждениях клеточной стенки

Локальное освещение было использовано для изучения процессов, связанных с микроповреждением КС. Показано, что интермедиаты, переносимые с потоком цитоплазмы, не только повышают флуоресценцию хлоропластов *F'*, но одновременно стимулируют и входящий поток H^+ через плазмалемму, вызываемый микроперфорацией КС (рис. 11). По-видимому, восстановительные эквиваленты, выступающие в качестве транспортируемого с потоком интермедиата, не только поступают в хлоропласты в области фонового освещения, но и поддерживают активность мембранной системы, ответственной за возрастание pH_o при повреждении

КС. В качестве такой транспортной системы может выступать НАДН оксидаза плазмалеммы.

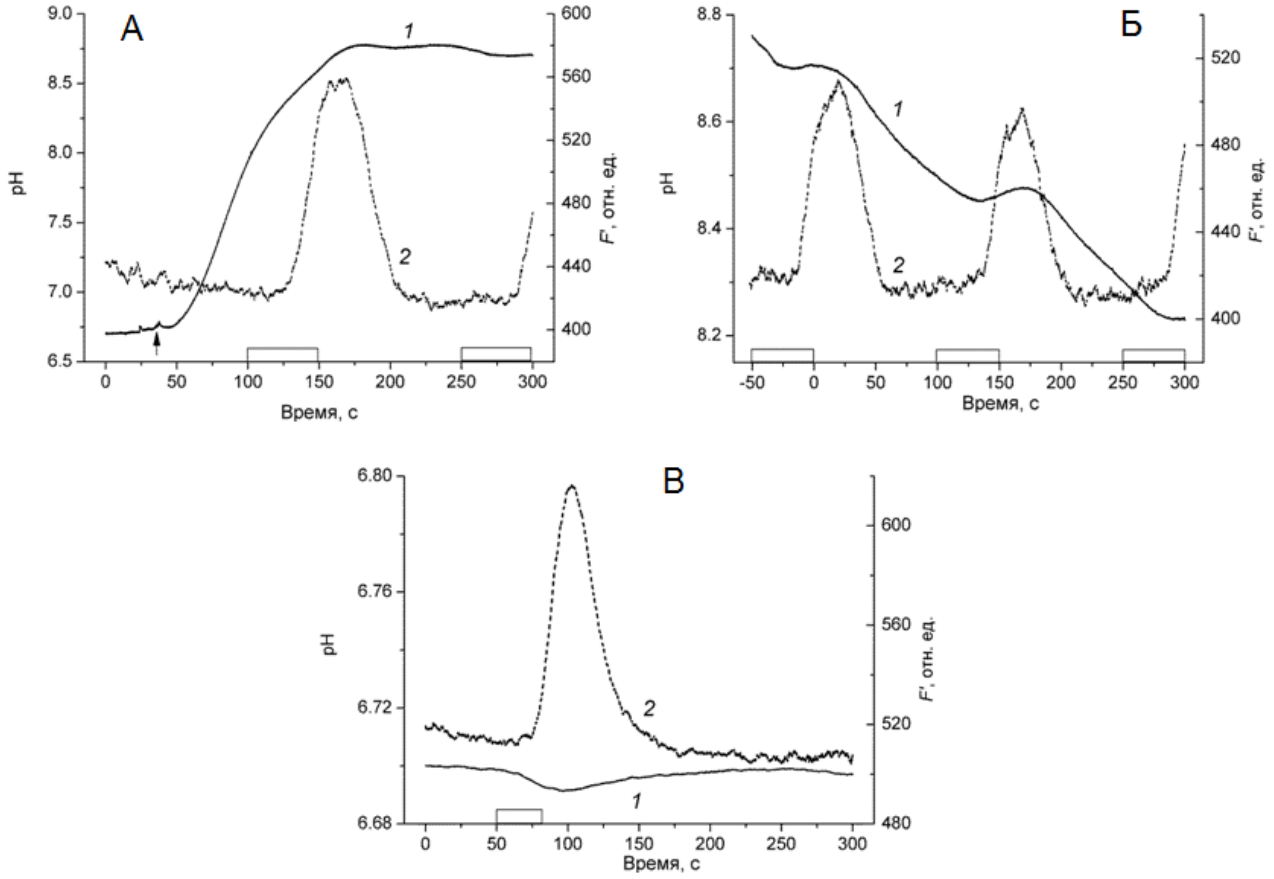

Рис. 11. Одновременная регистрация изменений pH_o (1) и флуоресценции хлорофилла (2) при локальном освещении участка, удаленного от места измерения на расстояние 1.5 мм. (А) Возрастание pH_o после микроукола клеточной стенки (отмечено стрелкой) и отклики флуоресценции *F'* и pH_o на локальное освещение (периоды освещения отмечены ступенями по оси x); (Б) синхронное возрастание *F'* и pH_o в ответ на локальное освещение удаленного участка, наблюдаемое на фоне снижения pH_o в области микроукола; (В) возрастание pH в ответ на локальное освещение удаленного участка специфично для области микроперфорации клеточной стенки и не проявляется в неповрежденных участках; ответная реакция *F'* на локальное освещение в интактной клетке проявляется так же, как в области микроперфорации.

Заключение

В работе показано, что трансмембранный обмен ионов Ca^{2+} и H^+ (OH^-), а также внутриклеточный транспорт при участии циклоза являются важными составляющими ответа растительной клетки *Chara corallina* на механический стресс. Обнаруженное быстрое локальное возрастание pH_o при механической стимуляции отражает протекание малоизвестного мембранного процесса, который вероятно выполняет

защитную функцию и повышает прочность клеточной стенки (КС). При сдвиге pH в область щелочных значений происходит активация ферментов, способствующих упрочнению КС (Bosch and Hepler 2005; Parre and Geitmann 2005). Таким образом, подщелачивание апопласта в ответ на механический стресс вызывает локальное увеличение жесткости клеточной стенки и защищает клетку от более сильного повреждения.

Течение цитоплазмы выступает в качестве важного участника регуляции и возникновения пространственной неоднородности фотосинтеза. Возрастание флуоресценции хлорофилла после освещения удаленной области клетки предположительно отражает восстановление первичного акцептора ФСII Q_A при поступлении фотосинтетически активного интермедиата из цитоплазмы в строму пластид. На рис. 12 представлена гипотетическая схема взаимодействий между отдаленными хлоропластами в интернодальных клетках *Chara corallina*. Регуляторный путь, лежащий в основе изменений флуоресценции *F'* при локальной фотостимуляции удаленной области клетки, состоит из трех основных этапов, происходящих в различных компартментах и частях клетки. В области приложения локального света происходит наработка и транспорт метаболитов через оболочку хлоропластов. Наиболее вероятен экспорт восстановительных эквивалентов из стромы хлоропластов в цитозоль, т.к. этот процесс ранее описан в литературе (Flügge and Heldt 1991; Foyer and Noctor 2009; Taniguchi and Miyake 2012). На оболочке хлоропластов функционирует оксалоацетат/малатный переносчик (ОМТ), который работает совместно с малатдегидрогеназой (МДГ). При избыточном накоплении НАДФН происходит превращение оксалоацетата в малат за счет работы МДГ. Перенос в цитоплазму восстановительных эквивалентов при участии системы ОМТ–МДГ приводит к накоплению НАДН. Попадая в цитоплазму, интермедиат транспортируется с потоком из ярко освещенной области на расстояния 1–5 мм в затенённые участки клетки.

Увеличение содержания НАДФН или НАДН в строме удаленных хлоропластов при участии переносчика окислительно-восстановительных эквивалентов вызывает в итоге восстановление пластохинонов и акцептора Q_A. Механизм этого влияния остается гипотетическим. С одной стороны, избыток НАДФН в строме и недостаток акцепторов ФСI в условиях непрерывного возбуждения обеих фотосистем может

способствовать фотохимическому восстановлению всех переносчиков в ЭТЦ фотосинтеза, включая Q_A, что приводит к возрастанию фактического уровня флуоресценции *F'*. С другой стороны, возможно, происходит нефотохимическое восстановление пластохинона (PQ) и Q_A за счет активности НАДФН-пластохинон редуктазы или ферредоксин-пластохинон редуктазы (Endo et al. 1997; Corneille et al. 1998).

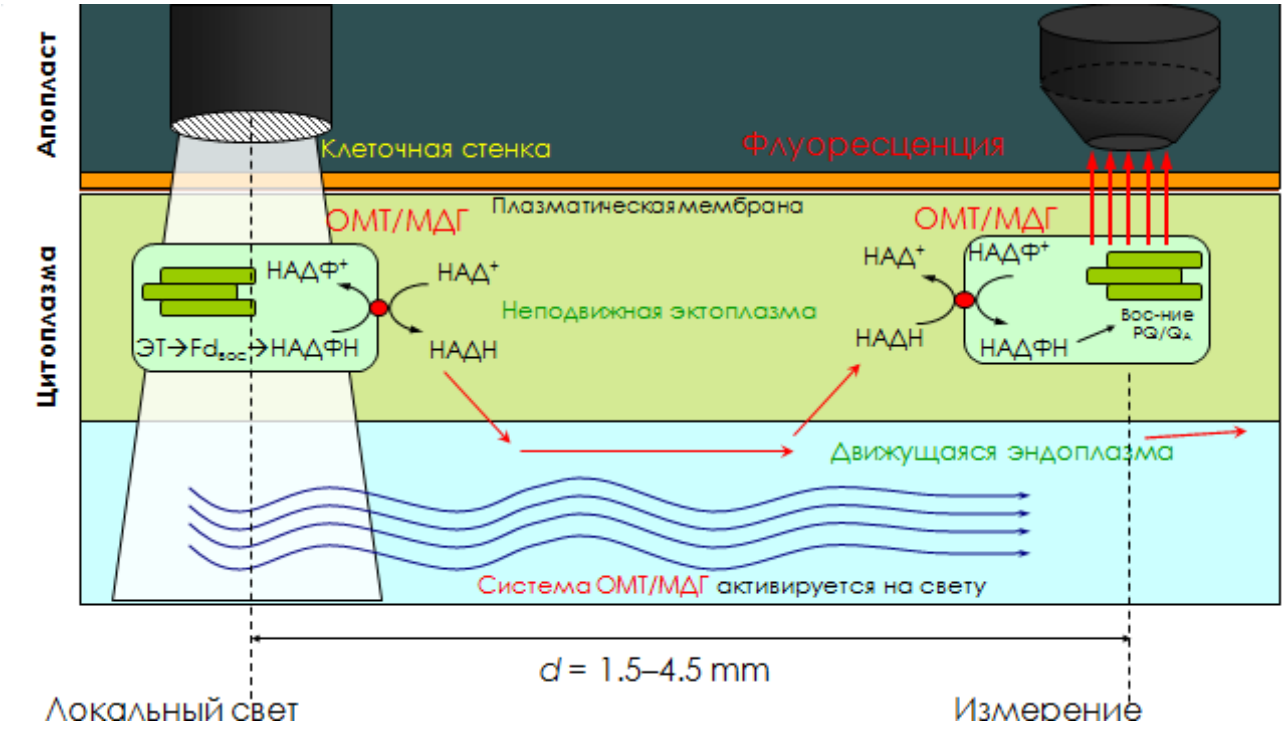

Рис. 12. Схема процессов, участвующих в дальних взаимодействиях между хлоропластами в интернодальных клетках Characeae. В области яркого освещения фотосинтетический электронный транспорт (ЭТ) приводит к восстановлению ферредоксина ($Fd_{вос}$) и стромальных акцепторов ($НАДФ^+$). Антипортер оксалоацетата и малата совместно с малатдегидрогеназой (ОМТ/МДГ) экспортируют избыток восстановителя в цитоплазму. Восстановительные эквиваленты в цитоплазме транспортируются с потоком движущейся эндоплазмы на расстояния до ~5 мм. Проходя вдоль затенённой части клетки, восстановители попадают из цитоплазмы в строму хлоропластов, что приводит к восстановлению Q_A и увеличению уровня фактической флуоресценции *F'*.

Такие регуляторные механизмы функционируют в условиях естественного освещения водорослей. Они включаются в действие при быстро меняющемся распределении солнечных бликов по длине междоузлий в природных водоемах. Сигналы, генерируемые в потоке цитоплазмы при непродолжительном попадании яркого светового луча на небольшой участок клетки, продолжают свое движение в

потоке и после прекращения светового импульса. Эти сигналы могут эффективно влиять на фотосинтез в участках, расположенных далеко от места падения яркого луча, и проявляться с длительной (до 100 с) задержкой после угасания импульса света. Роль движения цитоплазмы в дальних взаимодействиях между хлоропластами может заключаться в удалении из стромы избытка интермедиатов, образовавшихся под действием яркого света, при этом происходит минимизация повреждающего действия избыточного освещения. Кроме того, накопившиеся в области освещения восстановительные субстраты более равномерно распределяются по объему клетки за счет циклоза и используются фотосинтетическим аппаратом затенённых участков. Это повышает эффективность утилизации света в цикле восстановления углерода.

Одновременные измерения уровня флуоресценции хлоропластов F' и pH у поверхности клетки в месте микроперфорации в условиях локальной фотостимуляции удаленного участка клетки позволяют предположить, что поступление восстановительных эквивалентов с потоком жидкости способствует возрастанию pH_o в области микроповреждения КС. В генерации сдвигов pH на плазмалемме при микроповреждении возможно участвует НАДН оксидаза плазмалеммы; в этом направлении намечены дальнейшие исследования с применением новых электрохимических датчиков микро- и нанометрических размеров.

Таким образом, в данной работе показано, что фундаментальные клеточные процессы, такие как подвижность, возбудимость, фотосинтез, репарация повреждений и самоорганизация, находятся в постоянном взаимодействии и оказывают взаимное регуляторное влияние при участии трансмембранного обмена ионов и метаболитов и внутриклеточного транспорта.

Выводы

1. Впервые обнаружено, что при точечном механическом воздействии на клеточную стенку харовых водорослей *Chara corallina* происходит быстрое (10–30 с) увеличение pH у поверхности клетки с амплитудой до 3 ед. pH с последующим медленным (до 40 мин) восстановлением pH до исходного уровня. Локальное защелачивание служит важным элементом ответной реакции клетки на механический стресс.

2. Щелочной сдвиг у поверхности клетки, вызванный механическим воздействием на

клеточную стенку, зависит от условий освещения и редокс-состояния электрон-транспортной цепи фотосинтеза. Существенную роль в развитии pH ответа при микроперфорации играют механочувствительные Ca^{2+}-проводящие каналы и цитоскелет.

3. Распределение pH в области микроперфорации несимметрично по длине клетки и зависит от направления движения цитоплазмы. Размер щелочной зоны в области повреждения определяется в основном диффузией высвобождаемого в цитозоле компонента и частично циклозом.

4. Микроперфорация вакуолярной мембраны, сопровождаемая генерацией потенциала действия, вызывает образование щелочной зоны после длительной задержки (30–100 с) от момента укола и сопровождается повышением pH в вакуоле в связи с локальной утечкой H^+ в цитоплазму. Закисление цитоплазмы при перфорации тонопласта устраняет движущую силу ($\Delta\mu_{H+}$) для поступления H^+ из среды и препятствует формированию наружной щелочной зоны. Возобновление циклоза восстанавливает электрохимический градиент и входящий поток H^+.

5. Течение цитоплазмы участвует в распространении фотосинтетически активного интермедиата между ярко освещенными и затененными хлоропластами на расстояния до 5 мм. Изменения флуоресценции хлоропластов в ответ на освещение удаленного участка наблюдаются только в зонах, лежащих ниже по течению жидкости. Резкая остановка циклоза по-разному искажает симметрию волны изменений флуоресценции хлорофилла (F') в случаях, когда сигнальный агент достиг или не достиг зоны измерения F' в момент остановки.

6. Опосредованная циклозом передача сигнала инактивируется после темновой адаптации и подавляется агентами, нарушающими поток электронов в акцепторной части ФСI.

7. Механизмы образования светозависимых и механоиндуцированных щелочных зон существенно различаются, особенно по чувствительности к возрастанию внутриклеточного Ca^{2+}.

Список основных публикаций по теме диссертации

1. Алова (Комарова) АВ, Булычев АА, Черкашин АА (2012) Продольные профили pH вакуолярного сока в перфузируемых клетках харовой водоросли. *Биологические мембраны* **29**, 147-155.
2. Булычев АА, Алова (Комарова) АВ, Рубин АБ (2013) Изменения флуоресценции хлоропластов в клетках *Chara corallina*, свзянные с передачей фотоиндуцированного сигнала с потоком цитоплазмы. *Физиология растений* **60**, 38-46.
3. Bulychev AA, Alova (Komarova) AV, Bibikova TN (2013) Strong alkalinization of *Chara* cell surface in the area of cell wall incision as an early event in mechanoperception. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1828**, 2359-2369.
4. Bulychev AA, Alova (Komarova) AV, Rubin AB (2013) Propagation of photoinduced signals with the cytoplasmic flow along Characean internodes: evidence from changes in chloroplast fluorescence and surface pH. *European Biophysics Journal* **42**, 441-453.
5. Булычев АА, Комарова (Алова) АВ (2014) Дистанционная передача сигналов и регуляция фотосинтеза в клетках Characeae. *Биохимия* **79**, 353-363.
6. Булычев АА, Комарова (Алова) АВ (2014) Латеральный транспорт фотосинтетически активного интермедиата в покое и при возбуждении клеток *Chara*. *Биологические мембраны* **31**, 352-363.
7. Bulychev AA, Komarova (Alova) AV (2014) Proton flows across the plasma membrane in microperforated characean internodes: tonoplast injury and involvement of cytoplasmic streaming. *Protoplasma* **251**, 1481-1490.
8. Bulychev AA, Komarova (Alova) AV (2015) Photoinduction of cyclosis-mediated interactions between distant chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1847**, 379-389.
9. Булычев АА, Комарова (Алова) АВ (2016) Влияние света на pH апопласта при микроповреждении клеток *Chara corallina*. *Физиология растений* **63**, 52-59.
10. Bulychev AA, Komarova (Alova) AV (2016) Implication of long-distance cytoplasmic transport into dynamics of local pH on the surface of microinjured *Chara* cells. *Protoplasma* 1-11. doi:10.1007/s00709-016-0975-x
11. Komarova (Alova) AV, Bulychev AA, Rubin AB (2015) Role of cytoplasmic streaming in long-distance interactions of chloroplasts in *Chara corallina* cell. *European Biophysics Journal* **44**(Suppl. 1), S224.
12. Komarova (Alova) AV, Bulychev AA (2014) Microelectrode study of H^+ redistribution in characean internodes during long-lasting and prompt responses to environmental cues. In: Microelectrodes: Techniques, Structures for Biosensing and Potential Applications (Ed. Kin Fong Lei,), Nova Biomedical New York, 271-292.