

ТЕЧЕНИЕ ЦИТОПЛАЗМЫ КАК ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЙ КОНВЕЙЕР: ВЛИЯНИЕ НА ФОТОСИНТЕЗ И ПОТОКИ H^+ В КЛЕТКАХ *Chara*

© 2020 г. А.А. Булычев, А.В. Алова, Н.А. Крупенина, А.Б. Рубин

Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова,
119991, Москва, Ленинские горы 1/12

E-mail: bulychev@biophys.msu.ru

Поступила в редакцию 08.11.2019 г.

После доработки 30.11.2019 г.

Принята к публикации 21.01.2020 г.

Клеткам гигантских размеров, таким как междуузлия харовых водорослей, свойственно быстрое (до 100 мкм/с) круговое течение цитоплазмы, которое участвует в дальних внутриклеточных взаимодействиях и координирует функциональную активность органелл в условиях неоднородного освещения. Конкретные функции интенсивного движения цитоплазмы остаются малоизученными. Сочетание локального освещения с измерением флуоресценции хлорофилла и внеклеточного рН на микроучастках клетки, расположенных ниже по течению цитоплазмы, представляет удобный инструмент для выявления латерального транспорта фотометаболитов и циклоз-зависимой регуляции плазмалеммного транспорта H^+ и фотосинтеза хлоропластов. В зоне интенсивного освещения хлоропласты экспортируют в поток восстановительные эквиваленты и триозофосфаты, которые распределяются по клетке и вызывают переходное возрастание флуоресценции хлорофилла в слабоосвещенных участках клетки вдали от места приложения фотостимула. Рассмотрены свойства опосредованных циклозом изменений флуоресценции, включая фотоиндукцию дальних взаимодействий, чувствительность к ингибиторам метаболизма, неоднородное пространственное распределение в освещенных клетках, а также постепенную (1–5 мин) инактивацию дистанционной передачи сигналов после помещения клетки в темноту. Показано стимулирующее влияние потенциала действия на дальнюю передачу сигналов. Обсуждается применение нового метода для изучения межклеточного транспорта метаболитов и анализа проницаемости плазмодесм.

Ключевые слова: течение цитоплазмы, дальняя сигнализация, неоднородные профили рН, дистанционная регуляция активности фотосистемы II, плазмодесмы.

DOI: 10.31857/S0006302920020106

Термин «внутриклеточный конвейер» нечасто встречается в публикациях по биофизике и биохимии клетки. Упоминание о конвейере напоминает о производственной непрерывно движущейся ленте с поступающими заготовками, которые подвергаются обработке по мере их продвижения от исходной позиции до места назначения. В клетках растений аналогичную роль выполняет движение цитоплазмы. Течение цитоплазмы известно уже почти 250 лет: впервые его описал итальянский физик Bonaventura Corti в 1774 г., разглядывая под микроскопом клетки водоросли *Chara*. За последние полвека достигнуты большие успехи в понимании механизма движения цитоплазмы [1, 2]. Значительно меньше известно о функциональной роли внутриклеточных потоков жидкости. Исходя из общих представлений,

предполагаемая функция течения цитоплазмы состоит в выравнивании внутриклеточных концентрационных градиентов [3, 4]. Поток распределяет вещества по клетке, доставляя их к межклеточным барьерам, что способствует перемещению сигнальных соединений и ассимилятов на дальние расстояния и в зоны активного роста. Конкретные примеры участия потока жидкости в клеточных процессах в настоящее время остаются единичными.

Дальний транспорт — один из важнейших процессов в растениях — всегда включает внутриклеточную и трансклеточную стадии, которые состоят в переносе вещества по цитоплазме и его прохождении через межклеточные контакты — плазмодесмы [4]. Для изучения транспорта веществ от клетки к клетке часто использовали микроинъекцию флуоресцентных красителей, таких как карбоксифлуоресцеин [5, 6]. Однако этот метод инвазивен, не обеспечивает точной

Сокращения: QA — первичный хинонный акцептор фотосистемы II, ФС II — фотосистема II, ФС I — фотосистема I.

локализации вводимого зонда в цитоплазму или вакуоль, а также нарушает клеточный состав и внутреннее давление в клетке, что осложняет однозначную интерпретацию получаемых результатов. В этой связи важную роль приобретает поиск неповреждающих методов и адекватных модельных объектов. Харовые водоросли филогенетически относятся к ближайшим родственникам высших растений [7] и представляют одну из наиболее удобных моделей растительной клетки.

Побеги водоросли *Chara* состоят из чередующихся гигантских интернодальных клеток и мелких узловых клеток. Крупные размеры междоузлий определяют наличие у них особых, во многом уникальных свойств. Эти клетки электрически возбудимы; на них были впервые выявлены потенциалозависимые и Ca^{2+} -управляемые ионные каналы плазмалеммы и тонопласта [8, 9]. На свету клетки хары проявляют способность к самоорганизации — образуют неоднородные продольные профили pH и фотосинтеза [10–15]. Они обладают исключительно быстрым (до 100 мкм/с) течением цитоплазмы [16, 17]. Им свойственна биогенная кальцификация, т.е. связанное с метаболизмом осаждение на клеточных стенках кристаллов кальция в зонах с высоким pH [18]. Эти клетки способны залечивать мелкие повреждения, что позволяет избежать больших потерь биомассы при гибели отдельной клетки [19, 20]. Цепочки клеток удобны также для изучения межклеточных контактов. Они идеально подходят для микрофлуориметрических измерений флуоресценции хлорофилла, поскольку хлоропласты неподвижны и расположены в один слой по периферии клеток.

Гигантские (до 10 см) размеры клеток *Chara corallina* и *C. australis* (до 20 см у *Nitellopsis*) диктуют необходимость особых механизмов передачи сигналов. В клетках малых размеров реагенты смешиваются за время менее 1 с, но для диффузии на расстояние 5 см потребовалось бы несколько недель. Очевидно, что харовые водоросли располагают другими средствами регуляции и координации клеточных процессов.

Быстрая передача сигналов может осуществляться за счет проведения электрических импульсов — потенциалов действия [21]. При скорости распространения потенциала действия около 1 см/с, электрический сигнал (кратковременная деполяризация длительностью ~2 с) и связанное с ним почти стократное повышение уровня Ca^{2+} в цитоплазме проходят волной по клетке за время менее 10 с. Однако потенциалы действия возникают лишь в неблагоприятных условиях (механическое воздействие, утечка электролитов из поврежденных клеток), но обычно отсутствуют у клеток в состоянии покоя. Основной путь передачи сигналов и метаболитов в физиологически

нормальных условиях — их перенос с потоком цитоплазмы. При толщине текущего слоя около 5 мкм и диаметре клетки 0.7 мм, через сечение цитоплазмы проходит объем ~1 нл/с. Хлоропласты лежат тесными рядами по периферии клетки на границе между подвижной эндоплазмой и неподвижным слоем эктоплазмы. К внутренней стороне слоя хлоропластов прикреплены актиновые филаменты, по которым, как направляющим, происходит АТФ-зависимое движение молекул миозина, нагруженных везикулами [20]. Везикулы увлекают за собой прилегающие слои воды, что создает круговое течение жидкости. Максимальная скорость движения достигается на границе между неподвижными хлоропластами и текущей эндоплазмой [3, 22]. Движение по замкнутому циклу называют ротационным. Встречные потоки разделены прозрачной нейтральной полосой. В этой полосе слой цитоплазмы сужается, не оставляя места для размещения пластид. Поток жидкости направлен по слабо закрученной спиральной траектории. Скорость течения сильно зависит от температуры и в меньшей степени от других физических факторов. Потенциал действия вызывает временную (на 30 с) остановку движения и медленное (5–10 мин) восстановление скорости течения до исходного уровня.

Распределение веществ по клетке с потоком жидкости имеет очевидный смысл лишь при условии неоднородного состава цитоплазмы. Такая ситуация возникает, например, при неравномерном освещении, когда яркий свет попадает на часть клетки, а другие части находятся в тени. Перенос избыточного количества продуктов световых реакций из зоны насыщающего освещения к хлоропластам, лежащим в зоне затенения, у которых возможности фиксации CO_2 использованы не в полную меру из-за нехватки этих продуктов, может внести прибавку в общий фотосинтез. Для эффективного внутриклеточного распределения фотометаболитов необходимо не только интенсивное течение цитоплазмы, но и наличие быстрого обмена между хлоропластами и цитоплазмой. Главные транспортные системы оболочки пластид — это так называемый «малатный клапан» и транслокатор триозофосфатов [23, 24]. Обе системы выполняют функцию переноса восстановительных эквивалентов (redox shuttles): они выводят NAD(P)H из освещенных хлоропластов, поскольку при линейном фотосинтетическом потоке электронов NADPH образуется в избытке по сравнению с АТФ. Оба переносчика светозависимы и теряют активность в темноте [24].

Влияние течения цитоплазмы на клеточные процессы можно изучать, подводя к клетке по оптоволокну узкий луч (диаметром 0.4 мм) и наблюдая за проявлениями фотостимуляции по изменениям флуоресценции хлорофилла и pH у

поверхности клетки на удалении 1–6 мм от места локального освещения [25, 26]. Флуоресценцию хлорофилла возбуждают слабым модулированным светом (метод импульсно модулированной флуорометрии, РАМ), который не влияет на состояние хлоропластов. Кроме того, всю клетку помещают на слабый фоновый свет (~ 10 мкмоль $\text{м}^{-2} \text{с}^{-1}$), который поддерживает фотосинтетический аппарат в активном состоянии. Измерения рН в перемешиваемом слое наружной среды позволяют судить о направлении и величине потоков H^+ через микроучастки плазматической мембраны.

Локальное освещение индуцирует экспорт метаболитов из стромы хлоропластов в цитоплазму, которая перемещается с максимальной скоростью на границе со стационарным слоем хлоропластов. Экспортируемые метаболиты движутся латерально в виде пакета, размер которого определяется длительностью освещения и скоростью течения цитоплазмы. Время нахождения метаболитов в пути, пока они не достигли анализируемого участка, определяет длительность лаг фазы ответных реакций флуоресценции и рН. Когда же метаболиты поступают в зону измерения, они вызывают переходные изменения обоих параметров. Эти изменения отражают дистанционное опосредованное циклозом регуляторное действие света на хлоропласты и плазматическую мембрану [27].

Первые результаты опытов с пространственным разделением зоны фотостимуляции и места наблюдения функциональных изменений опубликованы в ряде экспериментальных и обзорных статей [28–33]. В настоящей работе подытожены главным образом более поздние исследования, не отраженные в обзорах [31, 32].

При измерениях рН в слабощелочной области у поверхности клетки установлено, что локальное освещение соседних областей, лежащих выше в потоке цитоплазмы, приводит в течение 3–4 мин к образованию сильнощелочной зоны, с перепадом рН до 2 единиц между исходным и конечным значениями. При подведении луча на таком же удалении от места измерения, но ниже по течению цитоплазмы, образования щелочной зоны в том же участке клетки не происходило. Результаты говорят о том, что на свету хлоропласты высвобождают продукт, который переносится с потоком цитоплазмы и индуцирует образование наружной щелочной зоны [34]. Таким образом, генерация неоднородного профиля рН в интернодальных клетках при освещении тесно связана с движением метаболитов в потоке цитоплазмы.

В аналогичных опытах с короткими (30 с) экспозициями локального освещения измеряли сдвиги рН отдельно в щелочных и кислых зонах. При освещении участка клетки, расположенного

выше по течению цитоплазмы от места измерения, рН в щелочной зоне возрастал на ~ 0.05 рН, а в кислой — снижался. Время $t_{1/2}$ от начала локального светового импульса до половинного сдвига рН линейно зависело от расстояния d между источником света и местом измерения. Графики времени $t_{1/2}$ от расстояния для щелочной и кислой зон имели равный наклон (угловой коэффициент 17.4 ± 2 с/мм), однако время $t_{1/2}$ для кислой зоны было примерно на 15 с короче, чем для щелочной зоны, причем это различие сохранялось при варьировании расстояния d от 1 до 3 мм. Повидимому, существуют два разных интермедиата, один из которых попадает в цитоплазму раньше, чем другой. «Быстрый» интермедиат отвечает в первую очередь за активацию H^+ -насоса плазмалеммы, а «задержанный» — за повышение пассивной H^+ -проводимости. Судя по равному наклону линейных зависимостей $t_{1/2}$ от расстояния d , в потоке цитоплазмы оба интермедиата перемещаются с равной скоростью (около 60 мкм/с).

Метаболиты, экспортируемые хлоропластами на свету, воздействуют не только на плазмалемму, но и на хлоропласты, расположенные ниже по течению от зоны освещения. Это проявляется в переходном возрастании флуоресценции хлорофилла примерно на 25% после латентного периода от 20 до 30 с [35]. Возрастание флуоресценции говорит о том, что метаболиты, экспортируемые освещенными хлоропластами, достигают затененных областей, поступают в строму пластид и вызывают временное восстановление пула пластохинонов, включая первичный хинонный акцептор (Q_A), состояние которого определяет уровень свечения фотосистемы II (ФС II). Пик флуоресценции достигается примерно в то же время, когда происходят сдвиги рН. Однако графики достижения пика F' в зависимости от расстояния до источника света для щелочных и кислых зон совпадали, в отличие от сдвига аналогичных графиков для изменений рН. Следует отметить, что при повышенных интенсивностях светового фона локальное освещение индуцирует тушение флуоресценции, которое развивается вслед за начальной стадией возрастания свечения [25].

Применение ингибитора полимеризации актина (цитохалазина D), который полностью останавливает течение цитоплазмы [36], позволяет убедиться в микрофлюидной передаче сигнала-регулятора флуоресценции. Остановка движения сопровождается полным исчезновением изменений флуоресценции в ответ на локальное освещение удаленного участка клетки [37, 38], а отмывание клетки свежей средой и восстановление течения возобновляют ответную реакцию на локальный фотостимул. При промежуточных скоростях течения пик флуоресценции появляется с задержкой на десятки секунд, становится ши-

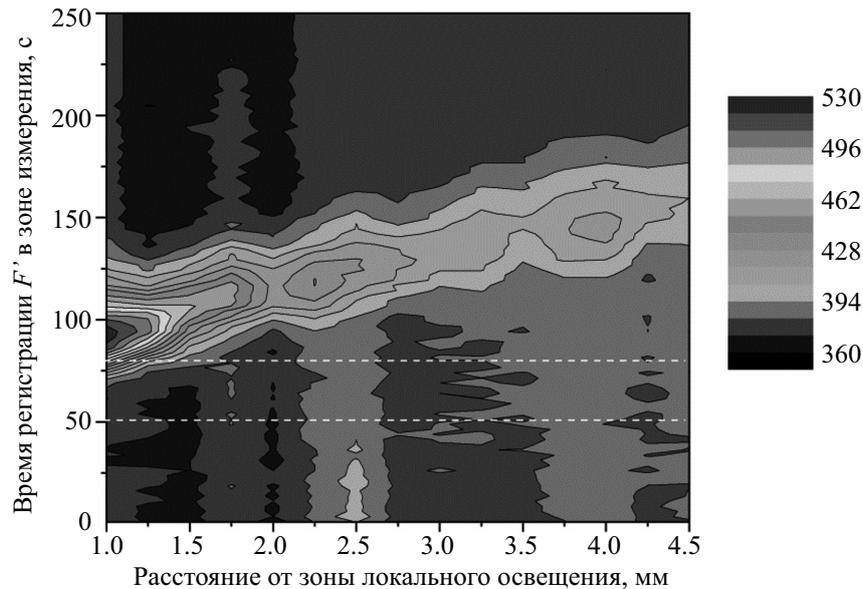


Рис. 1. Диаграмма изменений флуоресценции хлорофилла F' при разных расстояниях от области локального освещения до зоны измерения. Поток цитоплазмы направлен от места подведения световода к флуориметрируемому участку. Градации окраски соответствуют разной интенсивности флуоресценции. Горизонтальные штриховые линии отмечают моменты включения и выключения локального освещения (при $t = 50$ и 80 с от начала регистрации F' соответственно).

ре и меньше по амплитуде. Уширение имеет диффузионную природу: чем дальше по времени движется пакет метаболитов до поступления в зону анализа, тем сильнее сказывается диффузия на ширине пакета и форме изменений F' в ответ на действие локального освещения. При учете поступательного движения пакета метаболитов, их диффузии в процессе транслокации и частичного потребления метаболитов в ходе их продольного перемещения по клетке, удастся получить качественное соответствие экспериментальных данных и кинетических кривых изменений F' , рассчитанных на основе математической модели [27]. Модель описывала ход изменений F' как при равномерном поступательном движении цитоплазмы, так и в случае переменной скорости течения — при возобновлении циклоза после его временной остановки под влиянием потенциала действия.

Аналогичные модификации сигнала флуоресценции F' проявляются и при постоянной скорости течения, если увеличивать расстояние между источником локального света и областью измерения [38]. При коротких разделяющих расстояниях (1.0–1.5 мм) пик F' достигается сравнительно быстро и имеет большую амплитуду. На больших расстояниях ($d = 3.0$ – 4.5 мм) пик развивается после длительной задержки, а ширина полосы изменений F' возрастает. Зависимость расположения пика F' от расстояния можно представить диаграммой, показанной на рис. 1. Чем дальше отведен световод от зоны измерения, тем больше про-

ходит времени от момента включения локального света до достижения пика флуоресценции. Прямая, проведенная по пиковым значениям F' на этой диаграмме, позволяет рассчитать скорость движения метаболита, вызывающего дистанционные изменения флуоресценции. В данном случае при увеличении длины пути на 3.5 мм пик F' сместился на 65 с. Скорость распространения регуляторного фактора составила 54 мкм/с. Это примерно на треть меньше, чем скорость, измеряемая по движению частиц в проходящем свете микроскопа. Небольшое замедление переноса, возможно, связано с тем, что в процессе движения метаболит многократно и обратимо связывается с малоподвижными внутриклеточными структурами [39].

Главные стадии дальнейшей передачи метаболического сигнала различаются по локализации и выполняемым функциям: (1) образование и экспорт фотометаболитов в ярко освещаемом участке клетки, (2) перенос экспортируемых субстратов с потоком цитоплазмы на расстояния до 5–6 мм, (3) импорт триозофосфатов и восстановительных эквивалентов из потока жидкости в строму затененных хлоропластов и (4) биохимические и редокс-реакции, ведущие к восстановлению пластохинона и хинонного акцептора ФС II, что связано с появлением пика флуоресценции. После ухода метаболита из области измерения уровень F' , отражающий состояние хлоропластов, возвращается к норме, иногда с немонотонной кинетикой. Флуоресценция опускается на 2–3 мин чуть

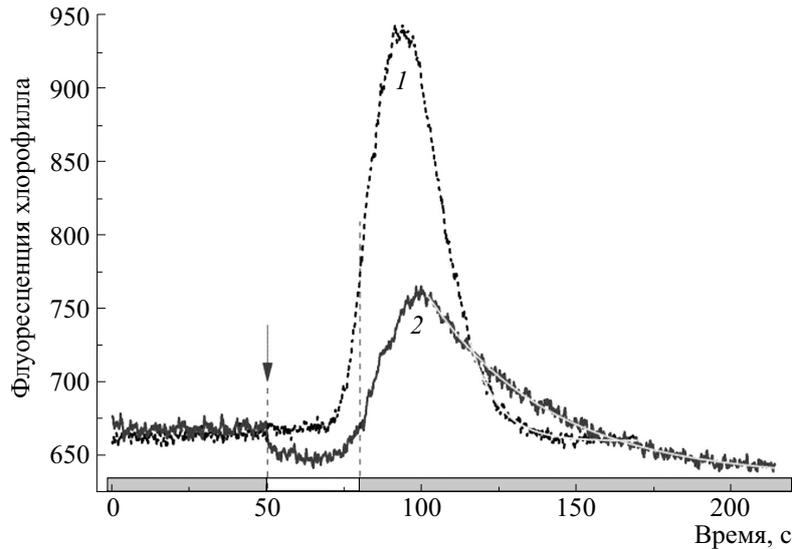


Рис. 2. Опосредованные циклозом ответы флуоресценции F' на локальное освещение участка, лежащего вдали от места регистрации F' , в условиях фоновой подсветки ($14 \text{ мкмоль квантов м}^{-2} \text{ с}^{-1}$, кривая 1) и при выключении фонового освещения одновременно с приложением локального светового импульса (кривая 2). Стрелка относится только к записи 2 и отмечает момент выключения фоновой подсветки. Кривые 1 и 2 — усредненные записи, полученные на пяти клетках.

ниже исходного уровня, а квантовый выход фото-реакции ФС II повышается. Одна из возможных причин такого пережеста в изменениях F' — усиленный отток электронов из пула пластохинона вследствие восстановительной активации ферментов фиксации CO_2 и повышенного потребления NADPH [39].

Для понимания роли и особенностей отдельных этапов микрофлюидной сигнализации важно выбрать избирательные воздействия на перечисленные стадии. Например, действие цитохалазина D на актиновые филаменты селективно подавляет стадию латерального транспорта метаболитов. К сожалению, во многих случаях невозможно разделить действие ингибиторов метаболизма на начальные и конечные стадии преобразования сигнала. В частности, передача сигнала необратимо подавляется при действии дифенилениодонима и метилвиологена [35]. Оба реагента нарушают перенос электронов на участке за фотосистемой I (ФС I). Известно, что дифенилениодоним подавляет ферредоксин-NADP редуктазу и флавиновые ферменты. Под действием метилвиологена CO_2 -зависимый фотосинтетический поток электронов переключается на восстановление O_2 . В покоящихся клетках *Chara* этот гербицид не проникает к мишеням своего действия даже после длительной (30 мин) инкубации. Однако его эффект проявляется мгновенно после однократной генерации потенциала действия [15, 40]. По-видимому, двухвалентно заряженный катион метилвиологена проникает в клетку по потенци-

ал-зависимым каналам, пропускающим Ca^{2+} и другие двухвалентные катионы. Результаты опытов с ингибиторами подчеркивают роль реакций, протекающих на акцепторной стороне ФС I и в стромах хлоропластов. Однако остается неясным, нарушает ли действие дифенилениодонима и метилвиологена образование и экспорт метаболитов (стадия 1), или же и реакции на терминальном участке сигнальной цепи (стадии 3, 4).

Известно, что обмен метаболитов между стромой хлоропластов и цитозолем зависит от света [41]. Опыты, направленные на темновую инактивацию и фотоактивацию ферментов, выявили сильную зависимость дальнейшей передачи сигналов от световых условий [26, 35]. На рис. 2 показаны переходные изменения флуоресценции F' после локального освещения клетки на слабом фоновом свете и в условиях, когда фоновый свет был выключен синхронно с началом импульса локального освещения. Ферменты инактивируются в минутном интервале, поэтому выключение фонового света одновременно с включением локального света прекращает световые реакции в области наблюдения, но не нарушает ферментативные процессы. При затемнении клетки амплитуда изменений флуоресценции снижается в два-три раза, а релаксация сигнала замедляется. Замедление спада изменений F' после переходного пика у помещенных в темноту клеток, очевидно, обусловлено прекращением фотохимической активности хлоропластов в области наблюдения. На свету ФС I окисляет пул пластохинонов, что обеспечивает сравнительно быстрое снижение F'

после прохождения пика, но в темноте ФС I неактивна и не участвует в окислении пластохинона/ Q_A . В этом случае окисление пластохинона/ Q_A происходит за счет альтернативных путей, например, при участии пластидной терминальной оксидазы.

Причина ослабления ответной реакции на локальный свет при переносе клетки в темноту не вполне ясна. С одной стороны, более сильные ответные изменения F' при фоновом освещении могут указывать на преобладание фотохимического (ФС II-зависимого) восстановления пластохинона/ Q_A в сравнении с нефотохимическим (темновой поток электронов от NADPH на пластохинон при участии антимицин-чувствительного сегмента циклической цепи [26]). Однако отдельные наблюдения не укладываются в это объяснение. В ряде случаев ответная реакция F' на локальный луч в отсутствие фонового освещения оказывается более сильной, чем на фоновом свету. Не исключено, что ослабление реакции на локальный свет, наблюдаемое после выключения светового фона, связано с возрастанием потерь транспортируемого метаболита по мере его продвижения с потоком. В начальный период затемнения цикл фиксации CO_2 и транслокаторы оболочки сохраняют активность, тогда как внутренние ресурсы NADPH не пополняются вследствие остановки фотореакций после переноса клетки в темноту. Дальнейшие исследования должны прояснить вопрос о том, в каких пределах меняется содержание транспортируемых метаболитов в цитоплазме при изменении световых условий.

Предварительное выключение фонового света постепенно ослабляло ответную реакцию на локальный световой импульс [26]. После двухминутной темноты амплитуда изменений была вдвое меньше, чем при выключении фона в момент начала локального светового импульса, а после 4.5-минутной темновой адаптации реакция на локальное освещение полностью исчезала. Эти изменения, вероятно, отражают инактивацию транслокаторов оболочки в области измерения флуоресценции. Тот факт, что трансмиссивное состояние сохраняется в темноте на протяжении нескольких минут, означает, что возрастание флуоресценции связано с темновым (нефотохимическим) потоком электронов от поступивших в строму восстановителей в пул пластохинонов и восстановлением хинонного акцептора Q_A .

При обратном переходе от темноты к фоновому освещению реакция флуоресценции на локальный фотостимул у адаптированных к темноте клеток поначалу отсутствует. После трехминутной слабой подсветки ответная реакция на локальное освещение удаленного участка полностью восстанавливалась [35]. Явление фотоиндукции дальнейшей передачи сигнала аналогично

фотоиндукции фиксации CO_2 . Как известно, индукция ассимиляции CO_2 отражает переход ферментов цикла Кальвина в активное состояние на свету при участии восстановленного тиоредоксина, получающего электроны от ФС I. Переход в трансмиссивное состояние у клеток хары, по-видимому, включает фотоактивацию транслокаторов оболочки.

Микрофлюидную сигнализацию изучали преимущественно на слабом свету, при котором измеряемые свойства клетки (флуоресценция, квантовый выход фотореакции ФС II, локальные значения pH на поверхности) распределены равномерно по ее длине. Если же клетка приобретает неоднородные свойства после экспозиции на ярком свету (чередующиеся щелочные и кислые зоны), то способность к дистанционной регуляции ФС II и флуоресценции хлорофилла становится также неоднородной по длине междоузлия. Опыты показали, что дистанционная регуляция флуоресценции хорошо выражена в кислых зонах и сильно ослаблена в щелочных зонах [26, 42]. При этом сдвиги pH в щелочных зонах в ответ на локальное освещение сохранялись, т.е. перенос метаболитов в потоке не был нарушен.

Разную эффективность передачи сигнала в щелочных и кислых зонах можно попытаться объяснить на основе так называемой CO_2 -гипотезы. Исходное положение состоит в том, что в кислой области повышено содержание углекислоты. Поэтому локальное освещение вызывает обильное производство и экспорт триозофосфатов, что и приводит к большим сдвигам флуоресценции F' на терминальном участке сигнальной цепи. Напротив, в щелочных зонах углекислота отсутствует; бикарбонат и карбонат ионы в клетку не проникают из-за наличия у них заряда; поэтому из-за нехватки субстрата цикла Кальвина–Бенсона нет производства и экспорта триозофосфатов.

Для оценки этой возможности мы измеряли переходные изменения флуоресценции хлорофилла в ответ на локальное освещение в зонах с разным наружным pH. График амплитуды изменений флуоресценции от pH в примембранных слоях имеет сигмоидный вид со значением pK около 9.3, тогда как pK для равновесия CO_2 – HCO_3^- составляет 6.3 [43]. Этот результат явно не укладывается в CO_2 -гипотезу. По-видимому, для передачи сигнала важна не концентрация CO_2 , а величина pH цитоплазмы, влияющая на транслокаторы оболочки и ферменты стромы. Трансмембранный поток протонов по-разному сдвигает pH на противоположных сторонах мембраны. Уместно привести хорошо известную аналогию: фотоиндуцированный перенос H^+ через тилакоидную мембрану приводит к противоположным сдвигам pH в тилакоиде и в строме. Сдвиги pH разного

знака происходят и на разных сторонах у поверхности бислоистой липидной мембраны при переносе через нее протонов в присутствии ионофоров или слабых оснований [44]. Точно так же перенос H^+ из цитоплазмы в наружный раствор через плазматическую мембрану вызывает не только закисление среды, но и повышение рН цитоплазмы. Соответственно, входящий в клетку поток H^+ вызывает щелочной сдвиг рН снаружи и должен закислять цитоплазму. Именно такое влияние потоков H^+ на рН цитоплазмы выявлено в растущих пыльцевых трубках лилии [45]. В зоне АТФ-зависимого выведения протонов на небольшом удалении от растущего кончика рН цитоплазмы был почти на 1 ед. выше, чем в области пассивного поступления H^+ (в апексе). Можно предполагать, что аналогичная закономерность соблюдается и в случае харовых водорослей.

Для проверки представлений о пониженном рН цитоплазмы как причине сильного подавления циклоз-зависимой передачи сигнала в области наружных щелочных зон можно использовать ряд воздействий. Одно из них состоит в возбуждении плазматической мембраны: генерация потенциала действия вызывает длительную остановку входящего потока H^+ и сильно ослабляет щелочные зоны [46–49]. После возбуждения рН у поверхности резко понижается, а остановка входящего потока H^+ должна вызывать щелочной сдвиг рН цитоплазмы. При этом амплитуда изменений флуоресценции в ответ на локальное освещение удаленного участка возрастала в пять-шесть раз [43]. Второй прием основан на подавлении входящего потока H^+ в области щелочных зон в присутствии NH_4^+ . Ионы аммония повышают рН цитоплазмы благодаря проникновению нейтральных молекул аммиака через плазматическую мембрану и последующему связыванию протонов в цитозоле. Значение pK для равновесия NH_3/NH_4^+ составляет 9.25. Высокий рН в щелочных зонах определяет повышенное содержание нейтральной депротонированной формы (NH_3), что способствует быстрому проникновению этой формы в цитозоль. На внешней стороне рН смещается при этом в кислую сторону. В присутствии NH_4^+ , так же как и после потенциала действия, изменения флуоресценции в ответ на локальное освещение в исходно щелочной зоне возрастали примерно в десятикратном размере [43]. Это подтверждает гипотезу о закислении цитоплазмы под щелочными зонами у освещенных клеток в физиологических условиях. В таком случае нарушения дальних межхлоропластных коммуникаций под наружными щелочными зонами связаны с понижением рН цитоплазмы в этих

участках клетки вследствие интенсивного входящего потока протонов.

Для дополнительной проверки CO_2 -гипотезы мы выясняли, насколько важна величина рН той области клетки, куда направлен локальный свет. Зная продольный профиль рН, можно расположить световод и область измерения в точках с известными значениями рН. Были выбраны четыре конфигурации измерений, условно названные по движению потока (1) из кислой зоны в кислую, (2) из кислой в щелочную, (3) из щелочной в щелочную и (4) из щелочной в кислую [26]. Если решающим фактором служит образование триозофосфатов за счет наличия CO_2 в наружных кислых зонах, то в конфигурациях (1) и (2) можно ожидать изменения F' одинаково большой амплитуды. Результаты получились качественно иными. Оказалось, не так важно, в щелочную или кислую область клетки был направлен локальный свет, а важен рН той области, где проводятся измерения. В конфигурациях 1 и 4 изменения F' были большими и примерно равными. А в конфигурациях 2 и 3 изменения были слабыми. Следовательно, причина различий состоит не в том, что хлоропласты кислой зоны образуют под ярким лучом много ассимилятов. Более вероятно, что различия рН цитоплазмы под щелочными и кислыми зонами сказываются на активности ферментов, участвующих в системе передачи и трансформации метаболического сигнала. Таким образом, терминальные стадии цепи передачи сигнала отличаются от стадий на начальном участке этой цепи повышенной чувствительностью к щелочному сдвигу рН на поверхности клетки [26]. Возможную роль в разной чувствительности проксимальных и дистальных сегментов сигнальной цепи играют неравные световые условия (интенсивные импульсы света в зоне экспорта метаболитов и непрерывное слабое освещение в зоне их импорта и дальнейшей переработки).

Представленный метод позволяет исследовать трансклеточный перенос метаболитов в клеточных цепочках [50]. Связь между клетками осуществляется по плазмодесмам — плазматическим тяжам, пронизывающим клеточные стенки. Плазмодесмы содержат отдельные нити актина, однако его содержание, по-видимому, недостаточно для поддержания сквозного течения цитоплазмы. Основной предполагаемый механизм прохождения ассимилятов через плазмодесмы — их диффузия. Предполагают, что проводимость плазмодесм подвержена тонкой регуляции. В качестве регулирующих факторов называют внутреннее гидростатическое давление, уровень Ca^{2+} в цитоплазме и другие. Традиционный подход к изучению проводимости плазмодесм состоит в том, что в клетку инъецируют флуоресцеин или его аналоги, а затем наблюдают за поступлением

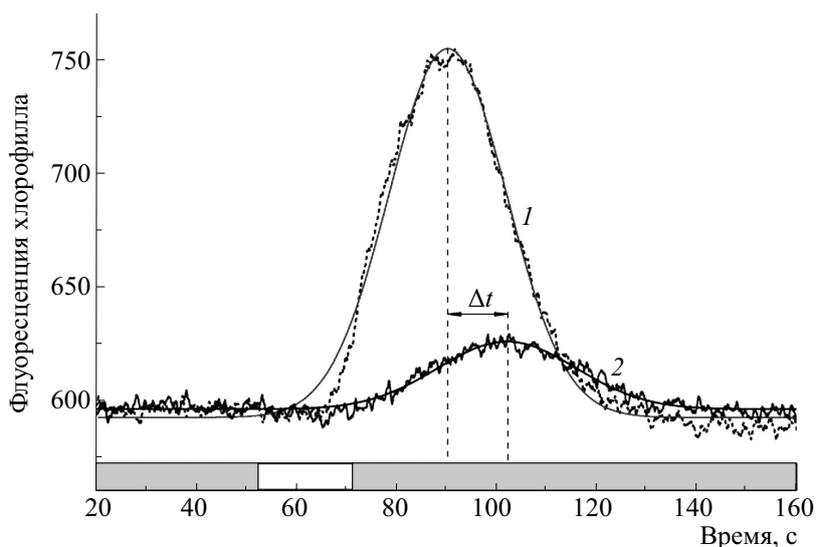


Рис. 3. Изменения флуоресценции хлорофилла F' , вызванные дистанционной передачей фотометаболитов в пределах одной интернодальной клетки (кривая 1) и в условиях их трансклеточного переноса между соседними междоузлиями (кривая 2). Расстояние между зоной локального освещения и областью измерения флуоресценции во внутриклеточной и трансклеточной конфигурациях было одинаковым ($d = 1$ мм).

зонда в соседние клетки [5, 6]. В сравнении с этим методом измерения флуоресценции хлорофилла имеют ряд преимуществ. Индикатором служит нативный флуоресцентный зонд — хлорофилл. Транспортируемые метаболиты образуются в физиологических количествах и только в цитоплазме. Отсутствует повреждение клетки, сопутствующее микроинъекции. Этот метод позволяет напрямую сравнивать перенос вещества по внутриклеточному и трансклеточному пути.

В двух используемых конфигурациях эксперимента источник света и область измерения разделены равным расстоянием, но в одном случае проксимальный и дистальный участки сигнальной цепи находятся в одной клетке, а в другом — в разных интернодальных клетках [50]. На рис. 3 показаны изменения флуоресценции F' , наблюдаемые при внутриклеточном и трансклеточном переносе метаболитов (кривые 1 и 2 соответственно). Судя по площади под кривой, из клетки в клетку проходит около 30% фотометаболитов от их количества, переносимого в клетке-доноре. Этот процент удивительно высок, принимая во внимание, что в торце интернодальной клетки поток цитоплазмы направлен тангенциально к клеточной стенке, а суммарная площадь сечения плазмодесм составляет <1% от пограничной межклеточной поверхности. Время преодоления межклеточного барьера составляет около 11 с и не зависит от расстояния между источником локального освещения и зоной измерения [50]. Зависимости времени достижения пика F' от разделяющего расстояния d при внутриклеточной и трансклеточной конфигурациях идут параллельно. Смещение по времени соответствует

преодолению трансклеточного барьера — одиночного слоя узловых клеток. Исходя из времени прохождения метаболита из клетки в клетку и данных о плотности расположения плазмодесм в пористой перегородке, можно оценить коэффициент диффузии метаболитов внутри плазмодесм. По нашим оценкам он составил $3.6 \cdot 10^{-8} \text{ см}^2/\text{с}$, что находится в близком соответствии с данными, полученными при микроинъекции флуорофоров на другом объекте (тычиночные волоски *Setcreasea purpurea*) [6].

Трансклеточный перенос метаболитов оказался весьма чувствителен к изменению осмотического давления среды. Замена стандартной среды на раствор с добавлением 0.15–0.20 М сорбита вызывала полное подавление трансклеточного переноса, но не оказывала влияния на внутриклеточный транспорт. Важно отметить, что осмотическое воздействие не оказывало влияния на скорость течения цитоплазмы и активность хлоропластов. Проводимость плазмодесм, блокируемая при повышении осмотического давления среды (при снижении внутреннего гидростатического давления) полностью восстанавливалась при отмывании клетки свежей средой. Полученные результаты заставляют пересмотреть сложившееся представление о том, что понижение внутреннего давления в клетках повышает проводимость плазмодесм [5, 51]. Результаты, полученные на интактных клетках, напротив, свидетельствуют о подавлении проводимости плазмодесм при осмотическом и солевом стрессе [50].

Таким образом, новый неинвазивный подход к изучению дальнего внутриклеточного и межклеточного транспорта уже дал разнообразные

новые сведения о роли циклоза в передаче метаболических сигналов и о свойствах плазмодесм. Одна из задач предстоящих исследований состоит в выяснении того, в каких пределах может меняться потребление и освобождение метаболитов хлоропластами на промежуточном сегменте сигнальной цепи при переходах свет–темнота и обратно. Вопросы микрофлюидной регуляции фотосинтеза, мембранных ионных потоков, нестационарных динамических структур и проводимости плазмодесм в норме и патологии представляют важное направление биофизики клетки и заслуживают дальнейшего изучения.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты №№ 16-04-00318 и 20-54-12015).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая работа не содержит описания каких-либо исследований с использованием людей и животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. M. Tominaga and K. Ito, *Curr. Opin. Plant Biol.* **27**, 104 (2015).
2. T. Shimmen, *J. Plant Res.* **120**, 31 (2007).
3. R. E. Goldstein and J.-W. van de Meent, *Interface Focus* **5**, 20150030 (2015).
4. W. F. Pickard, *Plant, Cell Environ.* **26**, 1 (2003).
5. K. J. Oparka and D. A. M. Prior, *Plant J.* **2** (5), 741 (1992).
6. E. B. Tucker and J. E. Tucker, *Protoplasma* **174**, 36 (1993).
7. T. Nishiyama et al., *Cell* **174**, 448 (2018).
8. V. Z. Lunevsky, O. M. Zherelova, I. Ya. Vostrikov, et al., *J. Membr. Biol.* **72** (1), 43 (1983).
9. G. N. Berestovsky and A. A. Kataev, *Eur. Biophys. J.* **34**, 973 (2005).
10. W. J. Lucas and R. Nuccitelli, *Planta* **150**, 120 (1980).
11. M. J. Beilby, T. Mimura, and T. Shimmen, *Protoplasma* **175**, 144 (1993).
12. A. A. Bulychev, A. A. Cherkashin, A. B. Rubin, et al., *Bioelectrochemistry* **53**, 225 (2001).
13. A. A. Bulychev, A. A. Polezhaev, S. V. Zykov, et al. *J. Theor. Biol.* **212**, 275 (2001).
14. N. A. Krupenina, A. A. Bulychev, M. R. G. Roelfsema, et al., *Photochem. Photobiol. Sci.* **7**, 681 (2008).
15. N. A. Krupenina, A. A. Bulychev, and U. Schreiber, *Protoplasma* **248**, 513 (2011).
16. N. S. Allen and R. D. Allen, *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* **7**, 497 (1978).
17. T. Shimmen and E. Yokota, *Curr. Opin. Cell Biol.* **16**, 68 (2004).
18. T. McConnaughey, *Limnol. Oceanogr.* **36**, 619 (1991).
19. D. Menzel, *Protoplasma* **144**, 73 (1988).
20. I. Foissner and G. O. Wasteneys, *J. Microsc.* **247** (1), 10 (2012).
21. M. J. Beilby, *Front. Plant Sci.* **7**, 1052 (2016).
22. N. Kamiya, *Protoplasmic streaming* (Springer, Wien, 1959).
23. R. Scheibe, *Plant Physiol.* **96** (1), 1 (1991).
24. M. Taniguchi and H. Miyake, *Curr. Opin. Plant Biol.* **15**, 252 (2012).
25. A. A. Bulychev, A. V. Alova, and A. B. Rubin, *Eur. Biophys. J.* **42**, 441 (2013).
26. A. A. Bulychev and A. A. Rybina, *Protoplasma* **255** (6), 1621 (2018).
27. A. V. Komarova, V. S. Sukhov, and A. A. Bulychev, *Funct. Plant Biol.* **45** (1–2), 236 (2018).
28. A. A. Bulychev and S. O. Dodonova, *Russ. J. Plant Physiol.* **58** (2), 233 (2011).
29. A. A. Bulychev and S. O. Dodonova, *Biochim. Biophys. Acta* **1807**, 1221 (2011).
30. A. A. Bulychev and A. V. Komarova, *Protoplasma* **251** (6), 1481 (2014).
31. A. A. Bulychev, in *Plant electrophysiology: methods and cell electrophysiology*, Ed. by A. G. Volkov, (Springer, Berlin, 2012), pp. 273–300.
32. A. A. Bulychev and A. V. Komarova, *Biochemistry (Moscow)* **79** (3), 273 (2014).
33. A. A. Булычев, *Дальние взаимодействия и передача сигналов в клетках харовых водорослей. Тимирязевские чтения – 76* (Наука, М., 2017).
34. S. O. Dodonova and A. A. Bulychev, *Protoplasma* **248**, 737 (2011).
35. A. A. Bulychev and A. V. Komarova, *Biochim. Biophys. Acta* **1847**, 379 (2015).
36. I. Foissner and G. O. Wasteneys, *Plant Cell Physiol.* **48** (4), 585 (2007).
37. A. A. Bulychev and I. Foissner, *Plant Signal. Behav.* **12** (9), e1362518 (2017).
38. A. A. Bulychev and A. V. Komarova, *Protoplasma* **254** (1), 557 (2017).
39. A. A. Bulychev, A. A. Rybina, and I. Foissner, in *Chloroplasts and cytoplasm: structure and functions*, Ed. by C. DeJesus and L. Trask (Nova Science, New York, 2018), pp. 1–24.
40. A. A. Bulychev and N. A. Krupenina, *Biochemistry (Moscow) Suppl. Ser. A: Membr. Cell Biol.* **2** (4), 387 (2008).
41. C. H. Foyer and G. Noctor, *Antioxid. Redox Signal.* **11** (4), 861 (2009).

42. A. A. Bulychev and A. V. Komarova, *Biochim. Biophys. Acta* **1858** (5), 386 (2017).
43. A. A. Bulychev and N. A. Krupenina, *Bioelectrochemistry* **129**, 62 (2019).
44. Y. N. Antonenko and A. A. Bulychev, *Biochim. Biophys. Acta* **1070**, 279 (1991).
45. J. A. Feijó, J. Saihas, J. R. Hackett, et al. *J. Cell Biol.* **144** (3), 483 (1999).
46. A. A. Bulychev and N. A. Kamzolkina, *Bioelectrochemistry* **69**, 209 (2006).
47. A. A. Bulychev, N. A. Kamzolkina, J. Luengviriya, et al., *J. Membr. Biol.* **202** (1), 11 (2004).
48. A. A. Bulychev and N. A. Krupenina, *Plant Signal. Behav.* **4** (8), 24 (2009).
49. N. A. Krupenina and A. A. Bulychev, *Biochim. Biophys. Acta* **1767**, 781 (2007).
50. A. A. Bulychev, *Protoplasma* **256** (3), 815 (2019).
51. V. Hernández-Hernández, M. Benítez, and A. Boudaoud, *J. Exp. Bot.* **71** (3), 768 (2020). DOI: 10.1093/jxb/erz434.

Cytoplasmic Streaming as an Intracellular Conveyor: Effects on Photosynthesis and H⁺ Fluxes in *Chara* Cells

A.A. Bulychev, A.V. Alova, N.A. Krupenina, and A.B. Rubin

Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/12, Moscow, 119991 Russia

Giant internodal cells of characean algae perform a fast (up to 100 $\mu\text{m/s}$) rotational cytoplasmic flow, which ensures long-distance intracellular interactions and coordinates the functional activity of organelles under nonuniform illumination. Specific functions of the rapid cytoplasmic streaming remain poorly understood. Combining local illumination, measurements of chlorophyll fluorescence and extracellular pH at the cell regions located downstream of locally applied light spot gives a convenient tool for detecting the lateral transport of photometabolites and cyclosis-dependent regulation of photosynthesis and plasma-membrane H⁺ transport. Brightly illuminated chloroplasts export reducing equivalents and triose phosphates; the streaming fluid distributes these metabolites over the cell leading to a transient increase in chlorophyll fluorescence in areas of dim illumination away from the light source. The properties of cyclosis-mediated changes in fluorescence, including photoinduction of long-range interactions, sensitivity to metabolic inhibitors, inhomogeneous spatial distribution in illuminated cells, and the gradual (1–5 min) inactivation of long-distance signal transmission after placing the cell in darkness are considered. The stimulatory effect of the action potential on long-range signal transmission is shown. Application of a developed novel technique for the study of intercellular transport of metabolites and analysis of plasmodesmal permeability is discussed.

Keywords: cytoplasmic streaming, long-range signaling, heterogeneous pH profiles, remote regulation of photosystem II activity, plasmodesmata