

УДК 577.352.4

РОЛЬ МЕМБРАННОГО ТРАНСПОРТА ПРОТОНОВ И ВОЗБУДИМОСТИ ПЛАЗМАЛЕММЫ В ПРОСТРАНСТВЕННЫХ СТРУКТУРАХ, ДАЛЬНЕМ ТРАНСПОРТЕ И ФОТОСИНТЕЗЕ ХАРОВЫХ ВОДОРОСЛЕЙ

© 2024 г. А. А. Булычев^{а,*}, Н. А. Крупенина^а

^аМосковский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, 119991 Россия

*e-mail: bulychev@biophys.msu.ru

Поступила в редакцию 03.04.2024

После доработки 25.04.2024

Принята к печати 26.04.2024

Плазмалемма освещенных клеток Characeae содержит чередующиеся участки с активностью H^+ -насоса и области с высокой проводимостью для H^+/OH^- , которые пропускают встречно направленные потоки H^+ между средой и цитоплазмой. В зонах оттока H^+ из среды в клетку, рН на поверхности (pH_o) возрастает, а рН цитоплазмы (pH_c), напротив, снижается. Нехватка проникающего субстрата фотосинтеза (CO_2) и кислый сдвиг pH_c в области наружных щелочных зон способствуют переключению переноса электронов в хлоропластах с CO_2 -зависимого пути на восстановление O_2 , что сопряжено с повышением ΔpH в тилакоидах и усилением нефотохимического тушения (NPQ) возбужденных состояний хлорофилла. Влияние рН на пути переноса электронов лежит в основе согласованного неоднородного распределения pH_o и активности фотосинтеза у клеток в покое. При генерации потенциала действия (ПД) продольный профиль pH_o временно сглаживается, а распределение NPQ и активности ФСII становится резко неоднородным. Спрямление профиля pH_o обусловлено подавлением H^+ -насоса и пассивной H^+/OH^- -проводимости плазмалеммы под влиянием почти 100-кратного возрастания уровня Ca^{2+} в цитоплазме ($[Ca^{2+}]_c$) во время ПД. Повышение $[Ca^{2+}]_c$ стимулирует фотовосстановление O_2 в хлоропластах под внешними щелочными зонами и в то же время останавливает течение цитоплазмы, что вызывает накопление избытка H_2O_2 в цитоплазме в участках интенсивной продукции этого метаболита при слабом влиянии на зоны ассимиляции CO_2 . Эти изменения усиливают неоднородное распределение фотосинтеза и вызывают длительные колебания флуоресценции хлорофилла F_m' и квантовой эффективности линейного потока электронов на микроучастках клетки после генерации ПД.

Ключевые слова: Characeae, потенциал действия, транспорт протонов, осцилляции флуоресценции хлорофилла, течение цитоплазмы, дальний транспорт

DOI: 10.31857/S0233475524050056, EDN: cbuvjr

ВВЕДЕНИЕ

В 2024 г. исполняется 40 лет журналу «Биологические мембраны». В тематике журнала заметное место занимают мембраны растительной клетки и хлоропластов. В его выпусках нашли освещение такие темы, как влияние электрического потенциала тилакоидов на флуоресценцию хлорофилла [1], повреждение хлоропластов электрическим полем [2], светозависимый мембранный транспорт редокс-активных катионов [3], фототоки тилакоидных мембран [4], триггерное проникновение в клетки катионного прооксиданта [5], влияние

возбудимости и течения цитоплазмы на транспорт H^+ и фотосинтез [6, 7]. Водоросли *Chara*, близкие родственники высших растений, представляют удобный и интересный объект для изучения путей внутриклеточной регуляции.

Клетки междоузлий харовых водорослей достигают длины ≥ 10 см и сочетают такие неординарные свойства, как возбудимость, возникновение пространственных структур, быстрое ротационное течение цитоплазмы, а также изменения проводимости клеточной мембраны при гиперполяризации. Возбудимость проявляется в короткой (2–5 с) деполяризации

плазмалеммы в ответ на механические, химические и другие стимулы. На практике потенциал действия (ПД) вызывают пропусканием деполяризующего импульса тока (200 мс, 10 мкА/см²). Скорость распространения ПД составляет ~1 см/с, что обеспечивает наиболее быструю передачу сигналов в гигантских клетках Characeae.

В большинстве растительных клеток с размерами до 100 мкм смешивание реагентов и сигнальные взаимодействия происходят за счет диффузии. Однако диффузионный транспорт крайне неэффективен на больших расстояниях. В случае одномерной диффузии среднеквадратичное смещение молекул (x) от начальной координаты связано со временем переноса t соотношением $x^2 = 2Dt$, где D – коэффициент диффузии. Это означает, что диффузия низкомолекулярных веществ ($D \approx 10^{-5}$ см²/с) на расстояние 5 см в пределах клетки потребует около двух недель. Электрическое возбуждение преодолет такое же расстояние всего за 5 с, вызывая экстренную реакцию на стрессовое воздействие.

У харовых водорослей в покое основную роль в интеграции метаболизма и дальнейшей сигнализации играет круговое течение цитоплазмы (циклоз) со скоростью до 100 мкм/с при 25°C [8, 9]. Поток цитоплазмы проходит внутриклеточное расстояние длиной в 5 см за время ~10 мин, что вероятно достаточно для своевременной реакции клетки на медленно меняющееся окружение. Течение омывает слой плотно упакованных хлоропластов (Хп) с его внутренней стороны, где к хлоропластам крепятся актиновые филаменты [10, 11]. По этим тязам за счет гидролиза АТФ движутся молекулы миозина, нагруженные везикулами. Движение органелл вместе с примыкающими слоями воды создает поток, который облегчает обмен метаболитов между Хп и цитозолем. Скорость течения максимальна в месте приложения движущей силы, т.е. на границе с неподвижными хлоропластами, и снижается в направлении к оси клетки.

Активное течение цитоплазмы является необходимым условием возникновения пространственных структур. Находясь на свету, клетки междоузлий формируют на поверхности чередующиеся зоны с низкими и высокими значениями рН (~6.5 и 10) [12, 13]. Эти лабильные структуры связаны с протеканием круговых электрических токов. Роль генератора тока выполняет АТФ-зависимый Н⁺-насос плазмалеммы, локализованный в кислых зонах, а нагрузкой служат участки мембраны в щелочных зонах, обладающие высокой пассивной проводимостью для Н⁺ или их эквивалентов – анионов ОН⁻ [14]. Плотность круговых токов в области щелочных зон достигает 60 мкА/см²; в кислых

зонах она заметно меньше, что связано с большей площадью этих зон [12]. Отток протонов из среды вызывает щелочной сдвиг рН на поверхности клетки (рН₀); при этом поступление Н⁺ в клетку смещает рН цитоплазмы (рН_ц) в кислую сторону [15, 16]. Аналогично этому, выведение Н⁺ из цитоплазмы создает кислые зоны в прилегающих слоях наружной среды (в апопласте), но сдвигает рН_ц в сторону щелочных значений. Чередующиеся сдвиги рН на поверхности клетки и в цитоплазме лежат в основе неоднородного распределения активности фотосинтеза по длине клетки.

Неравномерное распределение рН и фотосинтеза, а также возбудимость и течение цитоплазмы тесно связаны между собой и оказывают существенное влияние на другие клеточные процессы, включая дальний транспорт, защиту от избыточного освещения и ответные реакции на механические повреждения. В данном обзоре на примере клеток харовых водорослей рассмотрено сопряженное влияние электрических, ионных и метаболических сигналов на неравномерное распределение рН и фотосинтеза в клетках зеленых растений и предложена рабочая гипотеза для объяснения этих связей.

ЗОНАЛЬНОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ рН₀ И ЕГО ОБРАТИМОЕ СГЛАЖИВАНИЕ ПОСЛЕ ВОЗБУЖДЕНИЯ КЛЕТКИ

Профили рН, измеряемые сканирующим рН-микроэлектродом на освещенном междоузлии длиной 50 мм (рис. 1а, кривые 1, 4), содержат до шести щелочных полос со значениями рН₀ около 10.0, которые чередуются с кислыми зонами (рН₀ 6.2–6.5). В молодых междоузлиях зоны с низкими и высокими рН₀ не имеют видимых отличий. Однако зрелые и стареющие клетки часто выглядят полосатыми. В этих клетках зеленые некальцинированные области чередуются с зонами осаждения кристаллов, главным образом СаСО₃, которые придают щелочным зонам белесую окраску. Неоднородный профиль рН₀ формируется только на свету, исчезает за время ~20 мин после переноса клеток в темноту, а также спрямляется на свету при подавлении фотосинтеза диуроном. Брефелдин А (БФА) – ингибитор внутриклеточного везикулярного транспорта – оказывает сильное подавляющее действие на щелочные зоны освещенных клеток [17]: величина рН₀ снижается от 9.5–10.0 на 2–2.5 ед. в течение 10 мин после добавления этого агента (рис. 1б). На нынешний день БФА является наиболее сильным известным ингибитором, действие которого не связано с подавлением фотосинтетического потока электронов. По-видимому, процессы

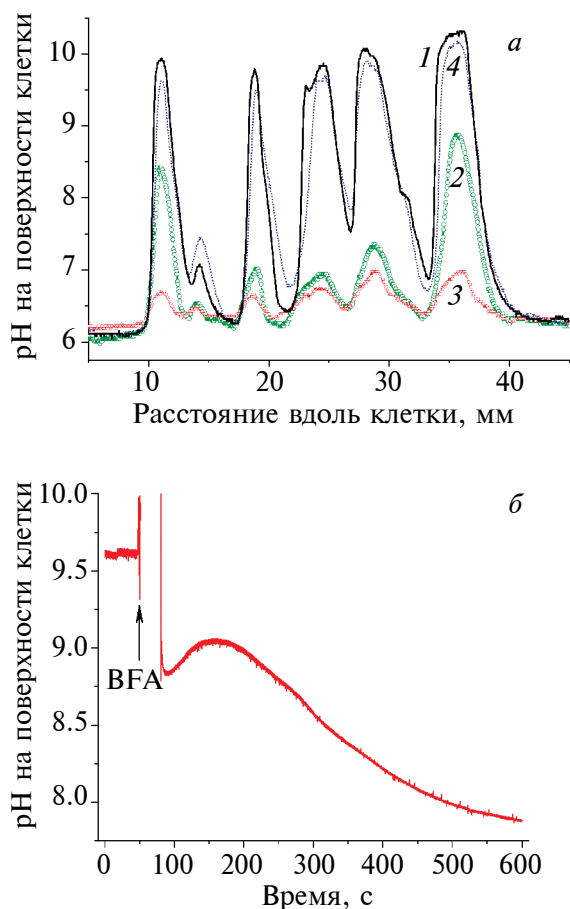


Рис. 1. Светозависимый профиль рН в примембранных слоях среды (pH_0) по длине интернодальной клетки *Chara* и чувствительность наружных щелочных зон к возбуждению плазмалеммы и ингибитору внутриклеточного везикулярного транспорта брефелдину А. а – Профили pH_0 в покое (сплошная кривая 1), а также через 2, 9 и 45 мин после генерации ПД (кривые 2–4 соответственно). б – Снижение pH_0 в щелочной зоне освещенной клетки после замены искусственной прудовой воды на аналогичный раствор с добавлением 70 мкМ брефелдина А (BFA); интенсивность света – 25 мкмоль/($\text{м}^2 \text{с}$).

эндо- и экзоцитоза, подавляемые брефелдином А, необходимы для поддержания транспортных систем, участвующих в трансмембранном переносе протонов. Кроме того, неоднородный профиль рН временно исчезает после генерации одиночного электрического импульса на плазмалемме [18] (рис. 1а, кривые 1–3).

Потенциал действия (ПД) в клетках харовых водорослей и других зеленых растений был предметом многочисленных работ и обзоров [11, 19–22]. Более 40 лет назад методом фиксации напряжения на клетках междоузлий *Nitellopsis* было показано, что деполяризация мембраны на фронте ПД обусловлена поступлением Ca^{2+} по

потенциал-зависимым неселективным катионным каналам из среды в цитоплазму, которое может дополняться потоком Ca^{2+} из вакуоли в цитоплазму [23]. Установлено также, что повышение уровня Ca^{2+} в цитоплазме ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) активирует выход Cl^- из цитоплазмы в среду, что отвечает за пиковую деполяризацию плазмалеммы. Возвращение мембранного потенциала к исходному или более низкому значению связано с выходящим потоком K^+ по каналам, активируемым при деполяризации.

В литературе нередко выдвигали предположения, что изменения уровня $[\text{Ca}^{2+}]_c$ вызваны не поступлением Ca^{2+} из среды, а высвобождением Ca^{2+} из внутриклеточных депо под влиянием инозитол-3-фосфат-чувствительной системы [24, 25]. Однако многие авторы отстаивали точку зрения, что повышение $[\text{Ca}^{2+}]_c$ обусловлено входящим потоком Ca^{2+} по каналам плазмалеммы [26, 27]. К тому же анализ нуклеотидных последовательностей в геномах растений не выявил присутствия рецепторов инозитол-3-фосфата (цит. по [11]). Вместе с тем недавно показана возможность высвобождения Ca^{2+} из эндоплазматического ретикулума в устьицах *Arabidopsis* под влиянием потока H^+ из среды в цитоплазму по экспрессированному фоточувствительным H^+ -селективным каналам [28]. Помимо Ca^{2+} , Cl^- и K^+ , небольшой вклад в ионные токи, измеряемые в режиме фиксации напряжения, могут вносить токи, создаваемые транспортом H^+ в освещенных клетках *Chara* в покое. Токи H^+ (30–60 мкА/ см^2) имеют значительно меньшую величину, чем пиковые значения Cl^- тока (до 1 мА/ см^2) [27].

Возбуждение клетки вызывает временную остановку трансмембранных встречных потоков H^+ , что проявляется в противоположно направленных сдвигах рН у поверхности клетки в щелочных и кислых зонах [18, 29]. Хотя сдвиги pH_0 в разных зонах имеют разную направленность, они синхронно достигают экстремальных значений и согласованно восстанавливаются по завершении переходного периода. После генерации ПД величина рН в щелочных зонах снижается почти на 3 ед., а в кислых зонах возрастает на 0.2–0.4 ед. Неравномерный профиль pH_0 сглаживается в течение 5–10 мин после генерации ПД (рис. 1).

Щелочные пики восстанавливаются в течение 35–40 мин от момента ПД, причем их исходное положение сохраняется. Устойчивое положение щелочных полос объясняют тем, что выравнивание профиля рН происходит на фоне неравномерного распределения других параметров, таких как отложения кристаллов кальция на поверхности клетки в участках с высоким рН [30] или преимущественная локализация в кислых зонах органелл

харасом, которые представляют собой инвагинации плазмалеммы, обогащенные H^+ -АТР-азой [31]. Растворение кристаллов $CaCO_3$ после сглаживания щелочных зон сопровождается локальным повышением рН, т.е. способствует формированию новой щелочной зоны на прежнем месте. Распределение H^+ -насосов, определяемое стабильной локализацией харасом, также не претерпевает изменений после генерации ПД. Активность этих насосов, вероятно, восстанавливается по мере снижения уровня $[Ca^{2+}]_c$ в период перехода к покою после генерации ПД.

Особенно неожиданным оказался тот факт, что распределение характеристик фотосинтеза — квантового выхода переноса электронов YII и нефотохимического тушения флуоресценции хлорофилла NPQ — в отличие от профиля рН, не сглаживается, а становится более неоднородным после генерации ПД [29]. Эта особенность выглядит на первый взгляд удивительной, потому что в покое профили YII и NPQ строго согласованы с профилем рН. Причины согласования профилей рН и фотосинтеза в покое и нарушения такой координации после генерации ПД рассмотрены ниже, после обсуждения влияния ПД на H^+ -транспортирующие системы плазмалеммы.

Подавляющее влияние $[Ca^{2+}]_c$ на H^+ -насос плазмалеммы известно уже давно. Оно предположительно опосредовано Ca^{2+} -зависимым фосфорилированием H^+ -АТР-азы [32, 33]. Ионы Ca^{2+} связываются с 14–3–3-белками, нарушая их физиологическое взаимодействие с H^+ -АТР-азой, необходимое для активации H^+ -насоса [34]. Однако влияние ПД на рН у поверхности клетки *Chara* не сводится только к Ca^{2+} -зависимому подавлению H^+ -насоса плазмалеммы, о чем говорят результаты параллельных измерений сопротивления плазмалеммы (R_m), мембранного потенциала клетки и рН в апопласте. В участках с наружными кислыми зонами следовые изменения R_m после возбуждения были незначительными, а в щелочных участках изменения R_m оказались неожиданно большими. В состоянии покоя проводимость плазмалеммы G_m ($G_m = R_m^{-1}$) в области щелочных зон была высокой и составляла около 10 См/м^2 , что соответствует ранее опубликованным данным [35]. На пике ПД проводимость мембраны дополнительно возрастала в несколько раз в связи с активацией хлорных и калиевых каналов.

Однако после пика ПД проводимость плазмалеммы в щелочных зонах резко снижалась: в течение 30–60 с величина G_m уменьшалась почти на порядок по сравнению с исходными значениями в покое [36]. Параллельно с падением G_m происходило

снижение рН_o, отражающее остановку входящего потока H^+ -эквивалентов, и развивалась переходная гиперполяризация мембраны на 50–60 мВ [37]. Это свидетельствует об инактивации H^+ -проводимости плазмалеммы в щелочных зонах после развития ПД. Мембрана этих участков временно теряет высокую H^+ -проводимость, но сохраняет K^+ -проводимость, что сдвигает мембранный потенциал от значений, близких к равновесному H^+ -потенциалу (E_H), в сторону E_K . Исходные значения проводимости восстанавливаются за время ≥ 15 мин после однократной генерации ПД. Этот период, по-видимому, необходим для восстановления низкого уровня $[Ca^{2+}]_c$ после его возрастания на пике ПД. Примерно такой же период после возбуждения (~10 мин при 21°C) необходим для полного восстановления течения цитоплазмы [38], которое, как известно, крайне чувствительно к $[Ca^{2+}]_c$. Повышение светового потока в интервале 10–150 мкмоль квантов/(м² с) способствовало более быстрому восстановлению щелочных зон, что, предположительно, обусловлено ускоренным снижением $[Ca^{2+}]_c$ на ярком свете в связи с поглощением Ca^{2+} освещенными хлоропластами [39].

ПРОФИЛИ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ В ПОКОЕ И ПРИ ВОЗБУЖДЕНИИ

О скорости линейного фотосинтетического потока электронов на микроучастках интернодальной клетки можно судить по величине эффективного квантового выхода реакции фотосистемы II (YII). Флуориметры с импульсно-модулированным освещением позволяют рассчитать величину YII по формуле $YII = (F'_m - F') / F'_m$, где F' — выход флуоресценции хлорофилла на действующем свете без дополнительной подсветки, а F'_m — максимальный выход флуоресценции в тех же условиях при действии насыщающего светового импульса. В стационарном состоянии фотосистемы I и II (ФС I и ФС II) работают согласованно. Поэтому величина YII отражает эффективность линейного потока электронов по всей ЭТЦ, в которой последовательно участвуют ФС II и ФС I. Метод насыщающих вспышек дает также сведения о нефотохимическом тушении ($NPQ = (F_m - F'_m) / F'_m$), показателем которого является максимальный выход флуоресценции F'_m на действующем свете в сравнении с максимальным выходом F_m в отсутствие тушения. Чем ниже F'_m по сравнению с F_m , тем выше значения NPQ.

У освещенных клеток в состоянии покоя профили рН_o, квантовой эффективности ФС II (YII) и NPQ по длине клетки четко скоординированы.

В основе координации лежит разная проницаемость плазмалеммы для заряженных и незаряженных форм неорганического углерода (C_i), количество которых варьирует по длине клетки в соответствии с профилем pH_0 [29, 40]. Относительное содержание анионов (HCO_3^- , CO_3^{2-}) и нейтральной формы (CO_2) зависит от локальных значений pH_0 и констант диссоциации (pK) угольной кислоты и бикарбоната ($pK_1 = 6.3$ и $pK_2 = 10.3$). Проницаемость бислоевых липидных мембран для нейтральных молекул CO_2 в 10^7 – 10^8 раз выше, чем для аниона HCO_3^- [41]. В кислых зонах значительная часть C_i присутствует в виде CO_2 — нейтральной свободно проникающей через мембраны формы, что обеспечивает хлоропласты достаточным количеством этого субстрата фотосинтеза. Наружные щелочные зоны лишены CO_2 и содержат лишь непроникающие ионные формы C_i (HCO_3^- , CO_3^{2-}). Поэтому CO_2 -зависимый путь переноса электронов облегчен в Хп, лежащих под наружными кислыми зонами, и затруднен в Хп щелочных зон. Лимитированное поступление C_i из наружной среды в области щелочных зон частично компенсируется доставкой этого субстрата с потоком цитоплазмы из участков, где содержание C_i повышено вследствие достаточного притока CO_2 .

Не меньшую роль в координации профилей pH и фотосинтетического транспорта электронов играют различия pH цитоплазмы в зонах притока H^+ в клетку и в зонах активного выведения H^+ . Поток H^+ -эквивалентов внутрь клетки в области щелочных зон понижает pH цитоплазмы, а выведение H^+ в области кислых зон повышает $pH_{ц}$ [15, 42]. Из-за нехватки CO_2 в щелочных зонах и вследствие пониженного $pH_{ц}$ перенос электронов в этих участках частично переключается с CO_2 -зависимого пути на восстановление O_2 . Оптимум pH для фотовосстановления O_2 интактными изолированными хлоропластами лежит в кислой области ($pH 5.0$) [43]. Кислые значения pH облегчают протонирование супероксид-анион-радикала и способствуют восстановлению $O_2^{\cdot -}$ до H_2O_2 . В свою очередь, H_2O_2 выступает как акцептор в реакции Хилла [44]. Так как поток электронов на H_2O_2 не связан с потреблением АТФ, он повышает энергизацию тилакоидных мембран (градиент $\Delta\mu_H^+$) и усиливает нефотохимическое тушение (NPQ) флуоресценции хлорофилла. Возрастание тепловых потерь снижает эффективность фотохимической реакции (параметр YII), что соответствует замедлению линейного потока электронов. При той же освещенности уровень энергизации мембран в Хп, где преобладает ассимиляция CO_2 , остается сравнительно низким, а величина NPQ — незначительной. Таким образом, в пределах одной

и той же интернодальной клетки Хп проявляют не только разные значения YII, но и качественные различия в путях переноса электронов. Это находит подтверждение в зеркально симметричных продольных профилях pH и концентрации O_2 у поверхности клетки [40]. Концентрация O_2 в щелочных зонах заметно понижена, что вероятно обусловлено фотовосстановлением O_2 в этих зонах.

В отличие от профиля pH , который сглаживается после проведения ПД (рис. 1а), продольный профиль фотосинтеза становится более контрастным (рис. 2). Это проявляется в возрастании перепадов эффективного квантового выхода ФСИ (YII) и уровней NPQ между различными участками по длине клетки [29]. На рис. 2 показан профиль NPQ, который при низкой интенсивности освещения был практически спрямлен у клетки в состоянии покоя. После генерации ПД в момент времени $t = 0$ величина NPQ в области щелочных зон возросла до значений 0.9–1.5 ед., тогда как в области кислых зон значения NPQ остались низкими (~0.05). Соответствующие изменения претерпел и продольный профиль YII. После генерации ПД эффективный квантовый выход фотореакции ФСИ снижился в зонах возрастания NPQ, но менялся незначительно в зонах с низкими значениями NPQ. Усиление пространственной неоднородности фотосинтетического потока электронов после возбуждения клетки обусловлено двумя факторами: влиянием повышения $[Ca^{2+}]_{ц}$ на пути фотосинтетического переноса электронов и влиянием $[Ca^{2+}]_{ц}$ на скорость течения цитоплазмы.

Повышение $[Ca^{2+}]_{ц}$, происходящее во время ПД, тормозит ассимиляцию CO_2 в реакциях цикла Кальвина [45–47] и в то же время оказывает

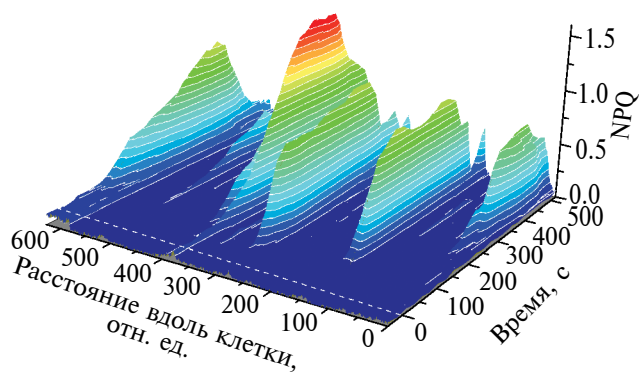


Рис. 2. Формирование неоднородного продольного профиля нефотохимического тушения (NPQ) в хлоропластах интернодальной клетки *Chara* после однократного возбуждения плазматической мембраны. В покое (при $t \leq 0$) профиль NPQ был однородным, но после генерации ПД он сменился профилем с множественными пиками NPQ. Момент генерации ПД при $t = 0$ отмечен на диаграмме штриховой линией.

стимулирующее влияние на фотовосстановление O_2 [48]. Наибольшая Ca^{2+} -зависимая стимуляция восстановления O_2 и продукции H_2O_2 ожидается в участках цитоплазмы под щелочными зонами, где кислые значения $pH_{ц}$ приближены к оптимуму pH для фотовосстановления O_2 . Так как перенос электронов на O_2 и H_2O_2 не связан с потреблением АТФ, он повышает ΔpH в тилакоидах, что усиливает NPQ в области наружных щелочных полос. В цитоплазме под кислыми зонами, где величина $pH_{ц}$ оптимальна для фиксации CO_2 и потребления АТФ, величина NPQ меняется сравнительно слабо.

Кроме того, остановка потока цитоплазмы в момент возбуждения и длительное (до 10 мин) восстановление скорости течения усиливают сами по себе неоднородность профилей YII и NPQ [49]. Это можно пояснить, используя аналогию между прерыванием течения цитоплазмы и остановкой работающего ленточного конвейера. Перемежающиеся участки клетки с разной фотосинтетической активностью отличаются по скорости экспорта метаболитов (H_2O_2 , NADPH) из хлоропластов в поток цитоплазмы. Движущаяся цитоплазма выступает как транспортное средство, аналогичное движущейся ленте производственного конвейера [50]. Под наружными кислыми зонами, где в хлоропластах преобладает поток электронов по ассимилирующему пути, побочная продукция H_2O_2 незначительна, а восстановительные эквиваленты (NADPH) используются в реакциях фиксации CO_2 . В хлоропластах под щелочными зонами, где часть электронов уходит на фотовосстановление O_2 , потребление восстановителей понижено, а продукция H_2O_2 — повышена. Хлоропласты этих участков служат источником поступления указанных метаболитов в цитоплазму.

Принято считать, что перенос веществ в потоке цитоплазмы сглаживает латеральные градиенты концентрации между областями с разным уровнем метаболитов [51, 52]. В таком случае внезапное прекращение потока цитоплазмы в момент генерации ПД, аналогичное остановке ленточного конвейера, должно переполнять цитоплазму экспортируемыми метаболитами в зонах их интенсивного производства. При этом в участках, где экспорт отсутствует или минимален, состав цитоплазмы изменится незначительно. Можно ожидать, что перепады концентраций H_2O_2 в цитоплазме между зонами с его интенсивной и слабой продукцией возрастают после остановки цикла. Это возрастание, вероятно, и отвечает за усиление перепадов между максимальными и минимальными показателями в профилях F_m' , NPQ и YII после генерации ПД.

КОЛЕБАНИЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ И ФОТОСИНТЕЗА ХЛОРОПЛАСТОВ ПОСЛЕ ВОЗБУЖДЕНИЯ КЛЕТКИ

Возрастание пространственной неравномерности состава цитоплазмы вслед за генерацией ПД и временной остановкой течения цитоплазмы приводит к еще одному интересному последствию — длительным колебаниям флуоресценции F_m' и квантового выхода YII при измерениях на микроучастке клетки [49, 53]. Однократное возбуждение плазмалеммы вызывает колебания F_m' с амплитудой до 40–50% от величины F_m' в покое, которые продолжают в течение 20–30 мин (рис. 3а). Об участии H_2O_2 в возникновении колебаний говорят опыты с возбуждением клетки в присутствии метилвиологена.

Метилвиологен (МВ) известен как эффективный акцептор электронов от ФСІ. Он катализирует восстановление O_2 до супероксид-анион-радикала, который в дальнейшем образует H_2O_2 в реакции дисмутации. Освещение изолированных хлоропластов в присутствии МВ приводит к быстрому образованию активных форм кислорода (АФК), включая H_2O_2 , причем оптимальные значения pH для фотовосстановления O_2 в норме и в присутствии МВ существенно различаются: pH 5 и pH 8, соответственно [43].

Плазматическая мембрана харовой водоросли в покое не пропускает двухвалентный катион МВ (MV^{2+}) [5, 54]. Так, инкубация клеток в течение 30 мин в присутствии 0.1–0.5 мМ МВ без электрической стимуляции не нарушала индукционные кривые фотоокисления хлорофилла реакционного центра ФСІ Р700 и квантовую эффективность (YII) в интактной клетке. Вместе с тем однократная генерация ПД вызывала быстрое проникновение МВ к участкам его связывания в Хп, что проявлялось в резком падении квантового выхода (YII) в области кислых зон, а также в замене характерной многофазной кинетики фотоокисления Р700 на простой ступенеобразный переход [5]. По-видимому, катион MV^{2+} попадает в клетку по неселективным катионным каналам, открываемым при деполяризации во время развития ПД. Известно, что эти каналы проводят ионы Ca^{2+} , гидратный радиус которых составляет 0.41 нм. Мгновенное появление каталитической активности МВ в хлоропластах после однократной генерации ПД говорит о том, что ионы MV^{2+} с радиусом 0.33 нм также проникают в клетку через эти каналы. Поскольку МВ действует как катализатор в циклах восстановления—окисления, поступление в клетку даже небольших количеств МВ за время ПД оказывается достаточным для переключения CO_2 -зависимого потока электронов на фотовосстановление O_2 с образованием АФК. В итоге генерация ПД

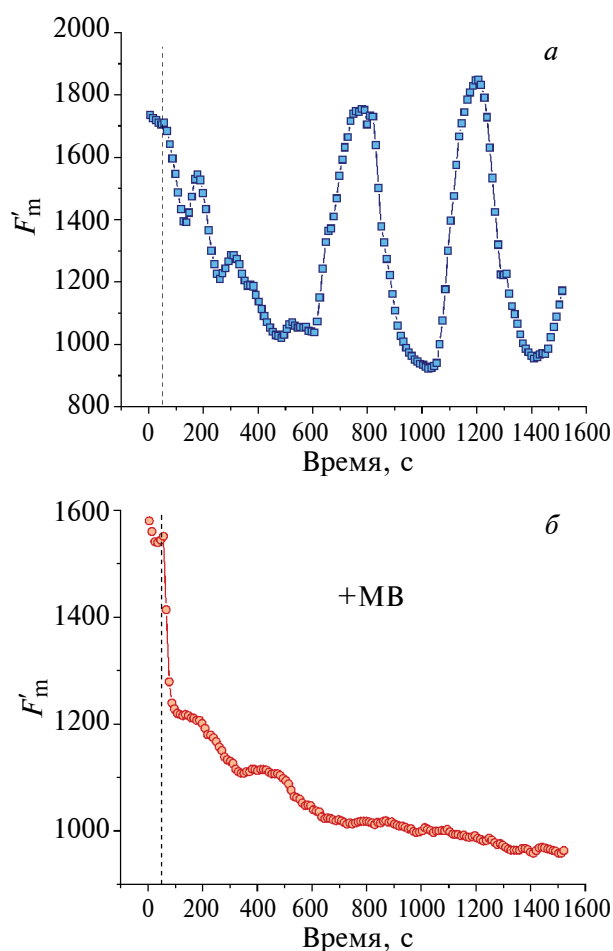


Рис. 3. Генерация ПД в стандартных условиях (интенсивность света $39 \text{ мкмоль}/(\text{м}^2 \text{ с})$) индуцирует (а) длительные периодические колебания флуоресценции F_m' , но вызывает (б) устойчивое тушение F_m' при наличии в среде 0.5 мМ метилвиологена (МВ). Момент генерации ПД отмечен вертикальными штриховыми линиями при $t = 50 \text{ с}$.

служит триггером для быстрого переключения CO_2 -зависимого пути переноса электронов на фотовосстановление МВ и O_2 [55].

Внесение в среду метилвиологена устраняло колебания F_m' в ответ на возбуждение (рис. 3б). Генерация ПД в присутствии МВ вызывала необратимое смещение F_m' к низкому уровню [49]. По-видимому, устойчивое нефотохимическое тушение F_m' при генерации ПД в присутствии редокс-медиатора МВ отражает накопление АФК (H_2O_2), тогда как колебания F_m' после ПД в отсутствие МВ обусловлены пространственно-неравномерным образованием АФК.

При возбуждении в отсутствие МВ, перепады в содержании H_2O_2 (акцептор электронов в реакции Хилла [44]) возрастают между зонами ассимиляции CO_2 и областями, где происходит

фотовосстановление O_2 . В условиях стационарного потока жидкости состав цитоплазмы на любом участке клетки поддерживается постоянным независимо от времени наблюдения, хотя он может варьировать по длине клетки. Кардинальные изменения наступают после вызванной потенциалом действия остановки течения цитоплазмы и возрастания перепадов в продольных профилях содержания АФК. Известно, что мембраны оболочки хлоропласта проницаемы для H_2O_2 : в зоне яркого освещения пероксид выходит из хлоропластов и переносится вдоль клетки с потоком цитоплазмы [56]. Мембранный транспорт H_2O_2 , по-видимому, опосредован аквапоринами внутренней мембраны оболочки хлоропластов [57–59]. По мере перемещения порций цитоплазмы с высоким и низким содержанием H_2O_2 , неподвижные хлоропласты получают из потока то большие, то меньшие количества этой АФК, что вызывает колебания уровней F_m' и NPQ. Согласно предлагаемой гипотезе, осцилляции флуоресценции F_m' и УП отражают вызванное остановкой циклоза усиление неравномерного продольного распределения H_2O_2 и других метаболитов, которое сохраняется длительное время после генерации ПД. Колебания флуоресценции продолжают примерно 20 мин, что почти вдвое превышает период восстановления циклоза. Следовательно, установление стационарного продольного распределения метаболитов (H_2O_2 , NADPH) требует большего времени, чем возобновление циклоза.

Роль неравномерного состава движущейся цитоплазмы как причины осцилляций флуоресценции F_m' и квантового выхода УП после генерации ПД проверяли двумя путями. Оба основаны на ограничении притока метаболитов в анализируемый участок клетки из соседних областей междоузлия. В первом варианте сравнивали влияние ПД на флуоресценцию хлорофилла в условиях общего освещения объекта и при локальном освещении малого участка клетки по центру области измерения [49, 60]. Общее освещение обеспечивает фотоиндуцированный обмен метаболитов между неподвижными хлоропластами и цитоплазмой по всей клетке, а циклоз способствует распространению этих метаболитов на дальние расстояния. Режим локального освещения отсекает дальние взаимодействия, так как затемнение большинства Хп прекращает образование в них фотометаболитов и инактивирует светозависимые транспортеры оболочки (малатный клапан и транслокатор триозофосфатов). Поэтому переход от общего к локальному освещению препятствует микрофлюидной доставке метаболитов в область измерения из других частей клетки, а взаимодействия

плазмалеммы и Хп ограничиваются узкой зоной освещения.

Сужение освещаемого участка клетки до диаметра 1 мм приводило к исчезновению длительных осцилляций F_m' и УП после генерации ПД, причем флуоресценция F_m' оставалась на высоком уровне (ср. рис. 3 и 4). Очевидно, что протекание фотосинтеза в пределах локально освещенной области исключает возникновение колебаний F_m' и УП в ответ на возбуждение клетки. Следовательно, для появления осцилляций необходимы обмен метаболитов за пределами области измерения, а также микрофлюидная доставка этих метаболитов из дальних частей клетки в исследуемую область.

Во втором варианте опытов влияние потока цитоплазмы на передачу сигналов от плазмалеммы к хлоропластам проверяли с помощью ингибитора циклоза и полимеризации актина – цитохалазина D (CD). Связывание CD с актиновыми микрофиламентами препятствует взаимодействиям актина и миозина, и, скорее всего, нарушение этих взаимодействий, а не деполимеризация актина объясняет остановку течения цитоплазмы у *Chara* [61]. При умеренном освещении CD не оказывает ингибирующего действия на квантовый выход ФСП (УП) и линейный поток электронов [62]. Подавление течения цитоплазмы цитохалазином D сопровождалось полным устранением длительных колебаний F_m' и УП. Изменения F_m' и УП зачастую ослаблялись слишком сильно и не могли служить надежным показателем возбуждения клетки. Поэтому о генерации ПД судили по измерениям мембранного потенциала плазмалеммы с помощью внутриклеточных микроэлектродов. Оказалось, что возбудимость клетки сохраняется в присутствии CD, а колебания F_m' и УП полностью исчезают [49]. Более того, отмывание клетки от цитохалазина D приводило к восстановлению циклоза и возобновлению длительных осцилляций F_m' и УП.

Тот факт, что генерация ПД вызывает периодические изменения F_m' (NPQ) и УП при активном течении цитоплазмы, но не оказывает такого эффекта после остановки потока, говорит о важной роли дальних микрофлюидных коммуникаций в возникновении колебаний. Следовательно, цитоплазма, протекающая через область измерения в течение 100–800 с после возбуждения плазмалеммы, характеризуется неоднородным содержанием ряда компонентов (предположительно, H_2O_2 при повышенной освещенности и восстановительных эквивалентов на слабом свете). На рис. 5 приведена предполагаемая схема сопряжения потоков H^+ через плазмалемму с фотосинтетической активностью хлоропластов в покое и при возбуждении.

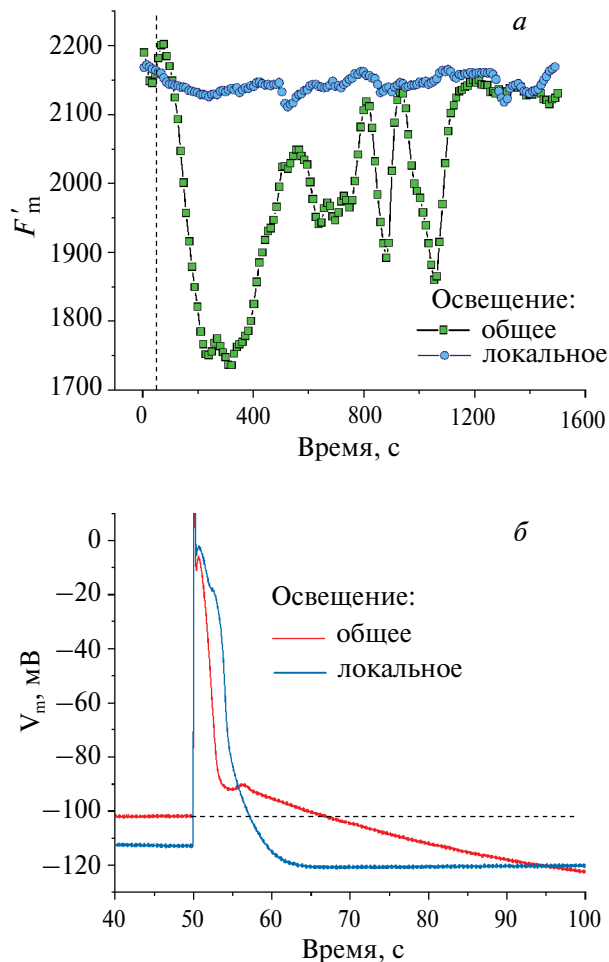


Рис. 4. Возбуждение плазматической мембраны (при $t = 50$ с) в интернодальной клетке *Chara* приводит к длительным колебаниям F_m' при общем освещении всей клетки, но не вызывает существенных осцилляций F_m' при локальном освещении участка диаметром 1 мм с центром в области измерения флуоресценции. *а* – Изменения флуоресценции хлорофилла F_m' в ответ на генерацию ПД при $t = 50$ с (момент возбуждения отмечен вертикальной штриховой линией) при общем и локальном освещении; *б* – изменения трансмембранного потенциала плазмалеммы, вызванные генерацией ПД при общем и локальном освещении.

Отмечено усиление неоднородности фотосинтетической активности и состава цитоплазмы при возбуждении как следствие остановки циклоза и стимуляции фотовосстановления O_2 при возрастании $[Ca^{2+}]_i$.

ПРОПУСКНАЯ СПОСОБНОСТЬ ПЛАЗМОДЕСМ В ПОКОЕ И ПОСЛЕ ВОЗБУЖДЕНИЯ

Измерения флуоресценции на микроучастках клетки в сочетании с локальным освещением

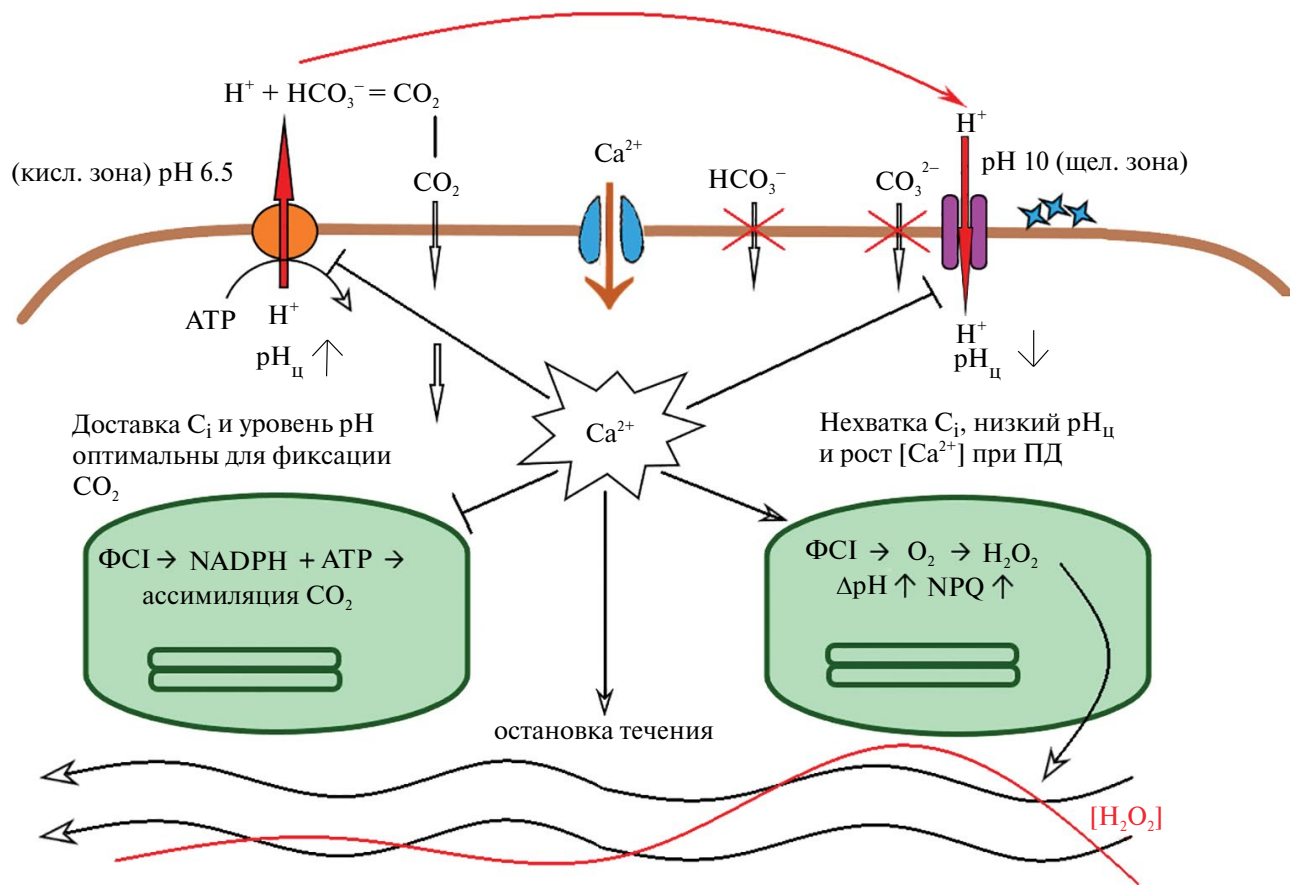


Рис. 5. Функциональные отличия «кислых» и «щелочных» зон интернодальных клеток *Chara* в покое и после генерации ПД на плазматической мембране. В кислых зонах на свету работает АТФ-зависимый H^+ -насос, что смещает pH_0 в слабокислую область и способствует преобразованию непроникающего аниона HCO_3^- в нейтральную проникающую форму CO_2 . Выведение протонов H^+ -насосом поддерживает слабощелочной pH цитоплазмы ($pH_{ц}$), способствующий фиксации CO_2 . Дуговая стрелка в периплазматическом пространстве изображает протекание электрического тока на внеклеточном сегменте круговой цепи. Для щелочных зон клетки характерны высокая H^+ -проводимость плазмалеммы, необходимая для поддержания суммарного баланса H^+ в цитоплазме, отсутствие проникающей формы углерода CO_2 , осаждение кристаллов $CaCO_3$ и сравнительно низкие значения $pH_{ц}$. Из-за нехватки CO_2 и пониженного $pH_{ц}$ фотосинтетический поток электронов частично переключен с ассимилирующего пути на восстановление O_2 с образованием H_2O_2 , который действует как акцептор реакции Хилла, вызывая нефотохимическое тушение (NPQ) флуоресценции хлорофилла. Накопление H_2O_2 в хлоропластах сопровождается его выведением в текущую цитоплазму и распространением H_2O_2 с потоком по длине клетки. Резкое возрастание $[Ca^{2+}]_{ц}$ при возбуждении вызывает подавление H^+ -насоса и H^+ -проводимости, что проявляется в сглаживании щелочных пиков, возрастании сопротивления мембраны в области щелочных зон и в переходной гиперполяризации клетки. Повышение $[Ca^{2+}]_{ц}$ во время ПД стимулирует фотовосстановление O_2 и образование H_2O_2 в участках с пониженным $pH_{ц}$, а также вызывает остановку течения цитоплазмы. Оба фактора усиливают неравномерное распределение АФК (H_2O_2) по длине клетки и отвечают за появление длительных осцилляций эффективного квантового выхода УП и максимальной флуоресценции F_m' как показателя нефотохимического тушения (NPQ) при наблюдении на микроучастках клетки.

участка в стороне от области измерения позволяют следить за передачей метаболического сигнала из ярко освещенных хлоропластов в пластиды, экспонированные на слабом или умеренном свете. Для этой цели подводят локальный фотостимул (диаметр луча 400 мкм, интенсивность ~ 500 мкмоль квантов/(m^2 с), длительность 30 с) к участку, который располагается в потоке цитоплазмы выше, чем область измерения флуоресценции (ОИФ). В зоне

локального освещения в текущую цитоплазму экспортируются фотометаболиты, которые с потоком достигают области измерения и вызывают переходные изменения фактической флуоресценции F' и максимальной флуоресценции F_m' [63, 64].

В опосредованных циклозом изменениях F' и F_m' участвуют метаболиты двух типов: вызванные ими изменения флуоресценции имеют разную направленность и отличаются по кинетическим

характеристикам [65]. Возрастание F' после освещения соседнего участка обусловлено экспортом и флуидным транспортом восстановленных соединений (предположительно, NADPH); оно выражено наиболее сильно при слабой фоновой подсветке (~ 10 мкмоль/($\text{м}^2 \text{ с}$)). Влияние локального освещения на F' проявляется независимо от того, направлен ли луч на участок с кислой или щелочной зоной. Однако изменения F' при локализации ОИФ в щелочной зоне были намного слабее, чем при расположении ОИФ в кислой зоне [64]. Ограниченное поступление восстановителя в хлоропласты под щелочными зонами, вероятно, обусловлено отсутствием соответствующего градиента концентрации на мембранах оболочки.

Тушение F_m' в ответ на удаленное локальное освещение проявляется при фоновом освещении повышенной интенсивности (~ 40 мкмоль/($\text{м}^2 \text{ с}$)), которая сама по себе недостаточна для снижения F_m' . Возможно, что дополнительное поступление АФК из области локального освещения на фоновом свете такой интенсивности повышает ΔpH до порогового уровня, при котором происходит сильное нефотохимическое тушение.

Метод приложения локальных световых импульсов в стороне от ОИФ полезен также для изучения межклеточного транспорта метаболитов [66]. Для этой цели важно обеспечить фиксированное расстояние между оптоволоконном, по которому подводят локальный световой импульс, и областью измерения флуоресценции. При этом щепочку из двух интернодальных клеток поочередно смещают так, чтобы в одном случае оптоволоконно и ОИФ располагались напротив одной клетки, а в другом были обращены к соседним междуузлиям. Измерения на сдвоенных междуузлиях при слабой фоновой подсветке показали, что узловой комплекс пропускает до 30–45% восстановленных метаболитов, экспортированных из хлоропластов клетки-донора, причем для их проникновения через узловой комплекс необходимо время около 12 с. В отличие от этого, фотометаболиты, вызывающие сильное тушение F_m' при их микрофлуидном транспорте в пределах одного междуузлия, не обнаруживали даже слабого проникновения через узловой комплекс [67].

Кратчайший путь связи между соседними междуузлиями образован двумя плоскими клетками, расположенными в центральной части узлового комплекса (цит. по [68]). Результаты опытов говорят о селективности межклеточных коммуникаций, опосредованных участием плазмодесм, которые представляют собой наноразмерные тяжи цитоплазмы, пронизывающие толстые клеточные

стенки. Становится очевидным, что плазмодесмы пропускают восстановленные соединения, вызывающие возрастание F' , но непроницаемы для агентов, вызывающих тушение флуоресценции F_m' [67]. К таким агентам, предположительно, относятся АФК (H_2O_2).

Используя пары интернодальных клеток в сочетании с методом локальных световых импульсов, можно изучать влияние ПД на перенос восстановительных эквивалентов через плазмодесмы. Остановка течения цитоплазмы, вызванная генерацией ПД, задерживает доставку метаболитов в ОИФ, что искажает типичную ответную реакцию F' на локальное освещение отдаленного участка клетки [69]. Пик переходного возрастания F' снижается и достигается со значительным запозданием. Вместе с тем ответная реакция F' , измеряемая после прохождения сигнала через узловой комплекс, подвергалась еще более сильному непропорциональному подавлению после генерации ПД. Результаты говорят о том, что влияние ПД на пропускную способность плазмодесм нельзя объяснить только изменениями скорости течения цитоплазмы.

По-видимому, узловой комплекс ведет себя как пропускная система, в которой время прохождения метаболита определяется свойствами плазмодесм, а не скоростью течения жидкости в интернодальных клетках. Интересным качеством этой пропускной системы является то, что количество проникающих метаболитов значительно уменьшается после генерации ПД, тогда как время пересечения этого барьера подвергается небольшим изменениям. Закрытие плазмодесм для межклеточного прохождения природных метаболитов при генерации ПД в соседних междуузлиях может быть физиологически значимой реакцией, направленной на перераспределение восстановительных эквивалентов между соседними интернодальными клетками. В условиях покоя эти метаболиты транспортируются из мест их избыточной генерации в зоны яркого освещения к слабо освещенным соседним клеткам, нуждающимся в NADPH для ассимиляции CO_2 . Генерация ПД может сигнализировать о повреждении клеточной стенки и необходимости восстановителей для устранения дефекта при участии плазмалеммной NADPH-оксидазы [70]. Переключение путей переноса восстановительных эквивалентов на внутренние нужды за счет ограниченного экспорта в соседние клетки может способствовать заживлению местных повреждений клеточной стенки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Источники финансирования. Работа выполнена в рамках научного проекта государственного задания МГУ № 121032500058-7.

Соответствие принципам этики. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Булычев А.А., Ниязова М.М., Рубин А.Б. 1987. Изменения флуоресценции хлоропластов при сдвигах мембранного потенциала и их зависимость от окислительно-восстановительного состояния акцептора фотосистемы II. *Биол. мембраны*. **4**, 262–269.
2. Ремиш Д., Булычев А.А., Рубин А.Б. 1990. Электроиндуцируемое нарушение барьерных свойств мембранной оболочки изолированных хлоропластов. *Биол. мембраны*. **7**, 382–389.
3. Булычев А.А., Цымбалюк Е.С., Лукашев Е.П. 1993. Использование необратимой электропорации и осмотических эффектов для доказательства светоиндуцированного накопления метилфеназона во внутреннем объеме тилакоидов. *Биол. мембраны*. **10**, 587–597.
4. Черкашин А.А., Булычев А.А., Вреденберг В.Я. 2000. Выходящая компонента фотоиндуцированного тока в хлоропластах *Peperomia metallica*. *Биол. мембраны*. **17**, 377–386.
5. Булычев А.А., Крупенина Н.А. 2008. Облегченное проникновение метилвиологена в хлоропласты *in situ* при генерации электрического импульса на возбудимой мембране растительной клетки. *Биол. мембраны*. **25**, 343–351.
6. Булычев А.А., Комарова А.В. 2014. Латеральный транспорт фотосинтетически активного интермедиата в покое и при возбуждении клеток *Chara*. *Биол. мембраны*. **31**, 352–363.
7. Булычев А.А., Алова А.В. 2022. Изменения флуоресценции хлоропластов в связи с возбудимостью клеток *Chara* и переносом метаболитов в потоке цитоплазмы. *Биол. мембраны*. **39**, 195–204.
8. Shimmen T. 2007. The sliding theory of cytoplasmic streaming: Fifty years of progress. *J. Plant Res.* **120**, 31–43.
9. Bulychev A.A., Cherkashin A.A., Shapiguzov S.Y., Alova A.V. 2021. Effects of chloroplast–cytoplasm exchange and lateral mass transfer on slow induction of chlorophyll fluorescence in Characeae. *Physiol. Plant.* **173**, 1901–1913.
10. Foissner I., Wasteneys G.O. 2012. The characean internodal cell as a model system for studying wound healing. *J. Microsc.* **247**, 10–22.
11. Beilby M.J., Casanova M.T. 2014. *The physiology of characean cells*. Berlin-Heidelberg: Springer. 205 p.
12. Lucas W.J., Nuccitelli R. 1980. HCO_3^- and OH^- transport across the plasmalemma of *Chara*. *Planta*. **150**, 120–131.
13. Bulychev A.A., Polezhaev A.A., Zykov S.V., Pljusnina T.Y., Rizinchenko G.Y., Rubina A.B., Jantsov W., Zykov V.S., Müller S.C. 2001. Light-triggered pH banding profile in *Chara* cells revealed with a scanning pH microprobe and its relation to self-organization phenomena. *J. Theor. Biol.* **212**, 275–294.
14. Beilby M.J., Bisson M.A. 2012. pH banding in charophyte algae. In: *Plant Electrophysiology*. Ed Volkov A.G. Berlin-Heidelberg: Springer, p. 247–271.
15. Feijó J.A., Sainhas J., Hackett G.R., Kunkel J.G., Hepler P.K. 1999. Growing pollen tubes possess a constitutive alkaline band in the clear zone and a growth-dependent acidic tip. *J. Cell Biol.* **144**, 483–496.
16. Bulychev A.A., Komarova A.V. 2014. Long-distance signal transmission and regulation of photosynthesis in characean cells. *Biochemistry (Moscow)*. **79**, 273–281.
17. Bulychev A.A., Foissner I. 2020. Inhibition of endosomal trafficking by brefeldin A interferes with long-distance interaction between chloroplasts and plasma membrane transporters. *Physiol. Plant.* **169**, 122–134.
18. Bulychev A.A., Kamzolkina N.A., Luengviriyi J., Rubina A.B., Müller S.C. 2004. Effect of a single excitation stimulus on photosynthetic activity and light-dependent pH banding in *Chara* cells. *J. Membr. Biol.* **202**, 11–19.
19. Wayne R. 1993. Excitability in plant cells. *Am. Sci.* **81**, 140–151.
20. Król E., Dziubinska H., Trębacz K. 2010. What do plants need action potentials for? In: *Action Potential*. Ed. DuBois M.L. New York: Nova Science, p. 1–26.
21. Hedrich R. 2012. Ion channels in plants. *Physiol. Rev.* **92**, 1777–1811.
22. Kisnieriene V., Trębacz K., Pupkis V., Koselski M., Lapeikaite I. 2022. Evolution of long-distance signaling upon plant terrestrialization: Comparison of action potentials in Characean algae and liverworts. *Ann. Bot.* **130**, 457–475.
23. Lunevsky V.Z., Zherelova O.M., Vostrikov I.Y., Berestovsky G.N. 1983. Excitation of Characeae cell membranes as a result of activation of calcium and chloride channels. *J. Membr. Biol.* **72**, 43–58.
24. Biskup B., Gradmann D., Thiel G. 1999. Calcium release from InsP_3 -sensitive internal stores initiates action potential in *Chara*. *FEBS Lett.* **453**, 72–76.
25. Wacke M., Thiel G., Hütt M.T. 2003. Ca^{2+} dynamics during membrane excitation of green alga *Chara*: Model simulations and experimental data. *J. Membr. Biol.* **191**, 179–192.
26. Tazawa M., Kikuyama M. 2003. Is Ca^{2+} release from internal stores involved in membrane excitation in characean cells? *Plant Cell Physiol.* **44**, 518–526.
27. Berestovsky G.N., Kataev A.A. 2005. Voltage-gated calcium and Ca^{2+} -activated chloride channels and

- Ca²⁺ transients: Voltage-clamp studies of perfused and intact cells of *Chara*. *Eur. Biophys. J.* **34**, 973–986.
28. Huang S., Shen L., Roelfsema R.M.G., Becker D., Hedrich R. 2023. Light-gated channelrhodopsin sparks proton-induced calcium release in guard cells. *Science*. **382**, 1314–1318.
 29. Krupenina N.A., Bulychev A.A., Roelfsema M.R.G., Schreiber U. 2008. Action potential in *Chara* cells intensifies spatial patterns of photosynthetic electron flow and non-photochemical quenching in parallel with inhibition of pH banding. *Photochem. Photobiol. Sci.* **7**, 681–688.
 30. Eremin A., Bulychev A., Krupenina N.A., Mair T., Hauser M.J.B., Stannarius R., Müller S.C., Rubin A.B. 2007. Excitation-induced dynamics of external pH pattern in *Chara corallina* cells and its dependence on external calcium concentration, *Photochem. Photobiol. Sci.* **6**, 103–109.
 31. Foissner I., Sommer A., Hoefftberger M. 2015. Photosynthesis-dependent formation of convoluted plasma membrane domains in *Chara* internodal cells is independent of chloroplast position. *Protoplasma*. **252**, 1085–1096.
 32. Lino B., Baizabal-Aguirre V.M., De La Vara L.E.G. 1998. The plasma-membrane H⁺-ATPase from beet root is inhibited by a calcium-dependent phosphorylation. *Planta*. **204**, 352–359.
 33. De Nisi P., Dell'Orto M., Pirovano L., Zocchi G. 1999. Calcium-dependent phosphorylation regulates the plasma-membrane H⁺-ATPase activity of maize (*Zea mays* L.) roots. *Planta*. **209**, 187–194.
 34. Sehnke P.C., DeLille J.M., Ferl R.J. 2002. Consummating signal transduction: The role of 14-3-3 proteins in the completion of signal-induced transitions in protein activity. *Plant Cell*. **14**, 339–354.
 35. Smith J.R., Walker N.A. 1985. Effects of pH and light on the membrane conductance measured in the acid and basic zones of *Chara*. *J. Membr. Biol.* **83**, 193–205.
 36. Bulychev A.A., Krupenina N.A. 2009. Transient removal of alkaline zones after excitation of *Chara* cells is associated with inactivation of high conductance in the plasmalemma. *Plant Signal. Behav.* **4**, 727–734.
 37. Bulychev A.A., Kamzolkina N.A. 2006. Differential effects of plasma membrane electric excitation on H⁺ fluxes and photosynthesis in characean cells. *Bioelectrochemistry*. **69**, 209–215.
 38. Tsuchiya Y., Yamazaki H., Aoki T. 1991. Steady and transient behaviors of protoplasmic streaming in *Nitella* internodal cell. *Biophys. J.* **59**, 249–251.
 39. Bulychev A.A., Kamzolkina N.A. 2006. Effect of action potential on photosynthesis and spatially distributed H⁺ fluxes in cells and chloroplasts of *Chara corallina*. *Russ. J. Plant Physiol.* **53**, 1–9.
 40. Bulychev A.A., Cherkashin A.A., Rubin A.B., Vredenberg W.J., Zykov V.S., Müller S.C. 2001. Comparative study on photosynthetic activity of chloroplasts in acid and alkaline zones of *Chara corallina*. *Bioelectrochemistry*. **53**, 225–232.
 41. Gutknecht J., Bisson M.A., Tosteson F.C. 1977. Diffusion of carbon dioxide through lipid bilayer membranes. *J. Gen. Physiol.* **69**, 779–794.
 42. Bulychev A.A., Komarova A.V. 2017. Photoregulation of photosystem II activity mediated by cytoplasmic streaming in *Chara* and its relation to pH bands. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1858**, 386–395.
 43. Hormann H., Neubauer C., Asada K., Schreiber U. 1993. Intact chloroplasts display pH 5 optimum of O₂-reduction in the absence of methyl viologen: Indirect evidence for a regulatory role of superoxide protonation. *Photosynth. Res.* **37**, 69–80.
 44. Neubauer C., Schreiber U. 1989. Photochemical and non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence induced by hydrogen peroxide. *Zeitschrift für Naturforsch. – Sect. C Biol.* **44c**, 262–270.
 45. Rocha A.G., Vothknecht U.C. 2012. The role of calcium in chloroplasts - an intriguing and unresolved puzzle. *Protoplasma*. **249**, 957–966.
 46. Stael S., Wurzinger B., Mair A., Mehler N., Vothknecht U.C., Teige M. 2012. Plant organellar calcium signalling: An emerging field. *J. Exp. Bot.* **63**, 1525–1542.
 47. Hochmal A.K., Schulze S., Trompelt K., Hippler M. 2015. Calcium-dependent regulation of photosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1847**, 993–1003.
 48. Wang W.H., Yi X.Q., Han A.D., Liu T.W., Chen J., Wu F.H., Dong X.J., He J.X., Pei Z.M., Zheng H.L. 2012. Calcium-sensing receptor regulates stomatal closure through hydrogen peroxide and nitric oxide in response to extracellular calcium in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* **63**, 177–190.
 49. Bulychev A.A., Strelets T.S. 2024. Oscillations of chlorophyll fluorescence after plasma membrane excitation in *Chara* originate from nonuniform composition of signaling metabolites in the streaming cytoplasm. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1865**, 149019.
 50. Bulychev A.A., Alova A.V., Krupenina N.A., Rubin A.B. 2020. Cytoplasmic streaming as an intracellular conveyor: Effect on photosynthesis and H⁺ fluxes in *Chara* cells. *Biophys. J.* **65**, 250–258.
 51. Pickard W.F. 2003. The role of cytoplasmic streaming in symplastic transport. *Plant, Cell Environ.* **26**, 1–15.
 52. Lu W., Gelfand V.I. 2023. Go with the flow – bulk transport by molecular motors. *J. Cell Sci.* **136**, 260300.
 53. Krupenina N.A., Bulychev A.A. 2007. Action potential in a plant cell lowers the light requirement for non-photochemical energy-dependent quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1767**, 781–788.
 54. Bulychev A.A., Krupenina N.A. 2008. Action potential opens access for the charged cofactor to the

- chloroplasts of *Chara corallina* cells. *Russ. J. Plant Physiol.* **55**, 175–184.
55. Krupenina N.A., Bulychev A.A., Schreiber U. 2011. Chlorophyll fluorescence images demonstrate variable pathways in the effects of plasma membrane excitation on electron flow in chloroplasts of *Chara* cells. *Protoplasma.* **248**, 513–522.
 56. Eremin A., Bulychev A., Hauser M.J.B. 2013. Cyclosis-mediated transfer of H₂O₂ elicited by localized illumination of *Chara* cells and its relevance to the formation of pH bands. *Protoplasma.* **250**, 1339–1349.
 57. Bienert G.P., Schjoerring J.K., Jahn T.P. 2006. Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochim. Biophys. Acta – Biomembr.* **1758**, 994–1003.
 58. Mubarakshina M.M., Ivanov B.N., Naydov I.A., Hillier W., Badger M.R., Krieger-Liszkay A. 2010. Production and diffusion of chloroplastic H₂O₂ and its implication to signalling. *J. Exp. Bot.* **61**, 3577–3587.
 59. Smirnov N., Arnaud D. 2019. Hydrogen peroxide metabolism and functions in plants. *New Phytol.* **221**, 1197–1214.
 60. Bulychev A.A., Alova A.V. 2022. Microfluidic interactions involved in chloroplast responses to plasma membrane excitation in *Chara*. *Plant Physiol. Biochem.* **183**, 111–119.
 61. Foissner I., Wasteneys G.O. 2007. Wide-ranging effects of eight cytochalasins and latrunculin A and B on intracellular motility and actin filament reorganization in characean internodal cells. *Plant Cell Physiol.* **48**, 585–597.
 62. Sommer A., Hoefftberger M., Hoepflinger M.C., Schmalbrock S., Bulychev A., Foissner I. 2015. Convolute plasma membrane domains in the green alga *Chara* are depleted of microtubules and actin filaments. *Plant Cell Physiol.* **56**, 1981–1996.
 63. Bulychev A.A., Komarova A.V. 2015. Photoinduction of cyclosis-mediated interactions between distant chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta – Bioenerg.* **1847**, 379–389.
 64. Bulychev A.A., Rybina A.A. 2018. Long-range interactions of *Chara* chloroplasts are sensitive to plasma-membrane H⁺ flows and comprise separate photo- and dark-operated pathways. *Protoplasma.* **255**, 1621–1634.
 65. Bulychev A.A., Alova A.V., Rubin A.B. 2013. Propagation of photoinduced signals with the cytoplasmic flow along Characean internodes: Evidence from changes in chloroplast fluorescence and surface pH. *Eur. Biophys. J.* **42**, 441–453.
 66. Bulychev A.A. 2019. Cyclosis-mediated intercellular transmission of photosynthetic metabolites in *Chara* revealed with chlorophyll microfluorometry. *Protoplasma.* **256**, 815–826.
 67. Bulychev A.A. 2022. Detection of cell-to-cell transport with chlorophyll microfluorometry: Selectivity of metabolite passage and sensitivity to sodium and potassium ions. *Russ. J. Plant Physiol.* **69**, 5.
 68. Beilby M.J. 2016. Multi-scale characean experimental system: From electrophysiology of membrane transporters to cell-to-cell connectivity, cytoplasmic streaming and auxin metabolism. *Front. Plant Sci.* **7**, 1–20.
 69. Bulychev A.A., Eremin A., von Rüling F., Alova A.V. 2023. Effects of cell excitation on photosynthetic electron flow and intercellular transport in *Chara*. *Protoplasma.* **260**, 131–143.
 70. Suzuki N., Miller G., Morales J., Shulaev V., Torres M.A., Mittler R. 2011. Respiratory burst oxidases: The engines of ROS signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* **14**, 691–699.

Role of Membrane H⁺ Transport and Plasmalemma Excitability in Pattern Formation, Long-Distance Transport and Photosynthesis of Characean Algae

© 2024 г. А. А. Bulychev^{1, *}, N. A. Krupenina¹

¹*Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Moscow, 119991 Russia*
**e-mail: bulychev@biophys.msu.ru*

Illuminated giant cells of Characeae comprise alternating areas with H⁺ pump activity and zones with high conductivity for H⁺/OH⁻, which create counter-directed H⁺ flows between the medium and the cytoplasm. In areas where H⁺ enters the cell, the pH on the surface (pH_o) increases to pH 10, while the cytoplasmic pH (pH_c) decreases. The lack of the permeant substrate of photosynthesis (CO₂) and the acidic pH_c shift in the region of external alkaline zones redirect electron transport in chloroplasts from CO₂-dependent (assimilatory) pathway to O₂ reduction. This electron transport route is associated with an increase in thylakoid membrane ΔpH and an enhanced nonphotochemical quenching (NPQ) of chlorophyll excitations, which underlies strict coordination between nonuniform distributions of pH_o and photosynthetic activity in resting cells. When the action potential (AP) is generated, the longitudinal pH profile is temporarily smoothed out, while the heterogeneity of the distribution of NPQ and PSII photochemical activity (YII) sharply increases. The damping of the pH_o profile is due to the suppression of the H⁺ pump and passive H⁺ conductance under the influence of an almost 100-fold increase in the cytoplasmic of Ca²⁺ level ([Ca²⁺]_c) during AP. The increase in [Ca²⁺]_c stimulates photoreduction of O₂ in chloroplasts under external alkaline zones and, at the same time, arrests the cytoplasmic streaming, which causes the accumulation of excess amounts of H₂O₂ in the cytoplasm in areas of intense production of this metabolite, with a weak effect on areas of CO₂ assimilation. These changes enhance the nonuniform distribution of cell photosynthesis and account for the long-term oscillations of chlorophyll fluorescence F_m' and the quantum efficiency of linear electron flow in microscopic cell areas after the AP generation.

Keywords: Characeae, action potential, proton transport, chlorophyll fluorescence oscillations, cytoplasmic streaming, long-distance transport