

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК БЕЛАРУСИ  
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЦЕНТР «БИОРЕСУРСЫ»  
ЦЕНТРАЛЬНЫЙ БОТАНИЧЕСКИЙ САД  
Отдел биохимии и биотехнологии растений

**ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ И ПРИКЛАДНЫЕ  
АСПЕКТЫ БИОХИМИИ  
И БИОТЕХНОЛОГИИ  
РАСТЕНИЙ**

Сборник научных трудов  
III Международной научной конференции  
14–16 мая 2008 г., Минск

*К 50-летию Отдела биохимии  
и биотехнологии растений*

Минск  
«Издательский центр БГУ»  
2008

УДК 581:576.3(043.2)  
ББК 28.55  
Т33

Научные рецензенты:

д-р биол. наук, проф., акад. НАН Беларуси *В. Н. Решетников*;  
д-р биол. наук, проф. *В. М. Юрин*;  
д-р биол. наук, проф. *В. Л. Калер*

Редакционная коллегия:

*В. Н. Решетников, О. П. Булко, И. И. Паромчик, Т. И. Фоменко,  
Е. В. Спиридович, Т. В. Антипова*

**Теоретические** и прикладные аспекты биохимии и биотехнологии растений : сб. науч. тр. 3-й Междунар. науч. конф., 14–16 мая 2008 г., Минск : к 50-летию Отд. биохимии и биотехнологии растений / НАН Беларуси, Центр. ботан. сад [и др.] ; редкол. : В. Н. Решетников [и др.] . — Минск : Изд. центр БГУ, 2008. — 562 с.  
ISBN 978-985-476-604-1.

В сборнике изложены результаты исследований по составу, свойствам, организации интерфазных клеточных ядер и пластид высших растений, путей регулярного воздействия на ядерный аппарат, включая реконструкцию генома с помощью трансгеноза. Представлены отдельные проблемы регуляции морфогенеза растительных клеток и микрклонального размножения некоторых культур, использования молекулярных маркеров в документировании ботанических коллекций. Рассмотрены биохимические основы практического использования растительных ресурсов.

УДК 581:576.3(043.2)  
ББК 28.55

ISBN 978-985-476-604-1

© Центральный ботанический сад  
НАН Беларуси, 2008

УДК 581.19

## ДИНАМИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ ФИТОХРОМНОГО СИГНАЛИНГА «ЯДРО-ХЛОРОПЛАСТ-ЯДРО»

**Калер В.Л.**

ГНУ «Центральный ботанический сад Национальной академии наук  
Беларуси» Минск 220012, ул. Сурганова 2В, e-mail: vkaler@msn.com

---

*Предложена новая концепция механизма сигналинга хлоропласт-ядро, основанного на сдвиге фотостационарного состояния фитохрома при накоплении хлорофилла. Гипотеза проверена на уровне динамической математической модели. Результаты численного эксперимента показали, что модель адекватно имитирует поведение системы фотосинтеза.*

Началом исследований органелл растительной клетки в Отделе биохимии и биотехнологии растений можно считать монографию А. С. Вечера [1]. Его ученик – В. Н. Решетников, развил это направление в сторону исследования ядра клетки и обосновал необходимость изучения взаимодействия (сигналинга) между этими органеллами [2].

Более 80 % белков хлоропластов (по массе) кодируются в ядерном геноме и синтезируются в цитоплазме растительной клетки высших растений. Содержание только ключевого фермента ассимиляции  $\text{CO}_2$  – рибулозобисфосфаткарбоксилазы-оксигеназы (РБФКО) составляет более половины общего белка хлоропластов. РБФКО построена из двух типов субъединиц, одна из которых кодируется в ядре и синтезируется в цитоплазме, другая – в геноме хлоропласта и синтезируется в хлоропласте. Апобелки реакционных центров и антенных комплексов обеих фотосистем фотосинтеза, а также ферменты синтеза хлорофилла, кодируются в пластомие и образуются в хлоропласте, а белки обслуживающего реакционные центры обеих фотосистем светособирающего комплекса кодируются в геноме ядра и синтезируются в цитоплазме. Все упомянутые белки функционируют в хлоропластах и оперативно управляются ядерным геномом в ответ на изменения внешних факторов (концентрация  $\text{CO}_2$ , интенсивность света, температура). Такое управление может реализоваться только при условии, что ядро получает сигналы обратной связи о состоянии и функционировании управляемых структур хлоропласта (сигналинг). Отлаженное взаимодействие структур ядра и хлоропласта обеспечивает необходимую надёжность, фотосинтетическую продуктивность и экологическую устойчивость аппарата фотосинтеза.

В литературе оживлённо обсуждается феномен сигналинга в растительной клетке, но пока еще нет общепринятого объяснения механизмов реализации этого важного явления на уровне функций. Известно несколько мнений о

механизмах трансдукции сигналов от хлоропластов к ядру [3]. По одной из двух наиболее популярных гипотез, сигналом служит специфический предшественник хлорофилла – Mg-протопорфирин- монометиловый эфир (Mg-ППМЭ), который блокирует синтез хлорофилла у некоторых мутантов хламидомонады [4]. Методами молекулярной генетики было показано, что Mg-ППМЭ подавляет экспрессию некоторых ядерных генов, например, генов белков теплового шока. Согласно второй гипотезе, сигналом от хлоропласта к ядру служат изменения окислительно-восстановительного состояния переносчиков электрона в цепи фотосинтетического транспорта (пластохинонов) [5]. Такие изменения могут быть индуцированы изменениями интенсивности внешних факторов. Обе эти гипотезы авторы иллюстрируют схемами, на которых сигналы от хлоропласта к ядру показаны в виде стрелок, но материальные носители этих сигналов не обсуждаются и не отмечены.

Возможен, однако, и принципиально отличающийся механизм сигналинга от хлоропласта к ядру. Известно, что экспрессия ядерных генов, кодирующих большинство ферментов фотосинтеза, индуцируется светом, рецептором которого является фитохром [6]. В основе выдвигаемой нами рабочей гипотезы лежат изменения интенсивности световых потоков на фитохром, который управляет светоиндуцируемой экспрессией ядерных генов. Механизмы фитохромного управления экспрессией ядерных генов изучены достаточно полно [7], но работы в этом направлении продолжаются. Изменения световых потоков, их спектрального состава и интенсивности, а также температурных условий изменяют фотостационарное состояние фитохрома. Наша рабочая гипотеза предполагает, что и изменение содержания в хлоропластах хлорофилла, вызываемое изменениями внешних факторов, способно выступать в качестве сигнала от хлоропласта, изменять спектральные параметры светового потока к локализованному в цитоплазме фитохрому. Вследствие смещения фотостационарного состояния фитохрома изменяется скорость переноса его активной формы (Фдк) в ядро [8], что адекватно изменит экспрессию фотоиндуцибельных генов ядра по общепринятому механизму.

Экспериментальная проверка этой гипотезы требует больших затрат труда и времени, поэтому представлялось полезным провести априорную оценку поведения системы «ядро-хлоропласт-ядро» на уровне динамической математической модели, построенной с учетом гипотезы. Концептуальная схема гипотезы показана на рисунке 1.

Фотостационарное состояние фитохрома определяется не только соотношением красного и дальнего красного света в приходящем потоке, но и изменением этого соотношения в результате избирательного поглощения света хлорофиллом, стационарная концентрация которого в листе растения зависит от сочетания внешних факторов. На это состояние мо-

жет влиять и поглощение активной формой фитохрома люминесценции хлорофилла, интенсивность которой увеличивается при световом насыщении фотосинтеза. Учтена и темновая, зависящая от температуры, конверсия активной формы фитохрома.

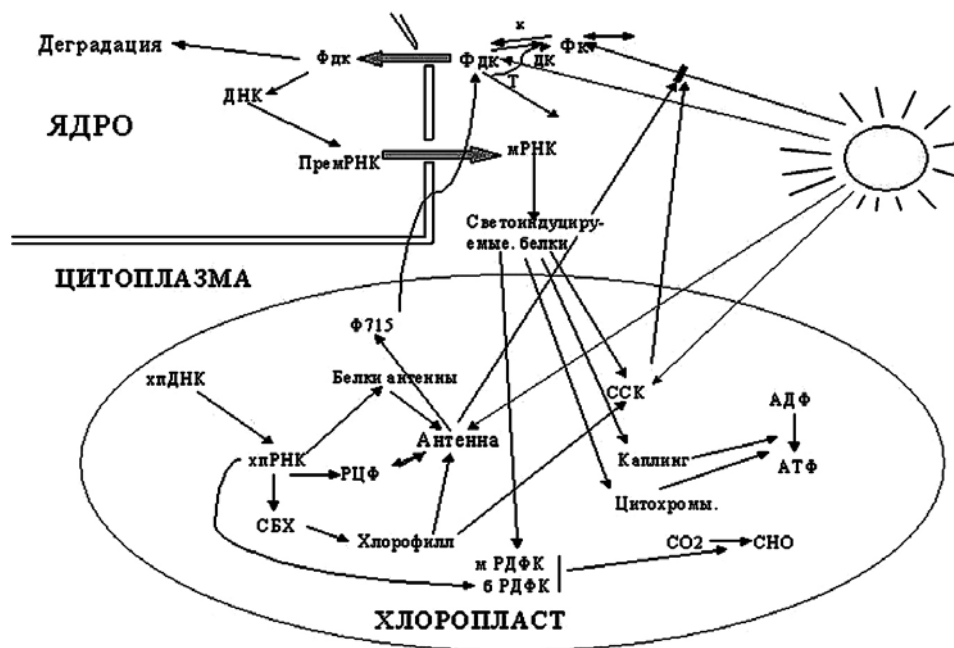


Рис. 1. Концептуальная модель рабочей гипотезы о механизме сигналинга.

Полицистронная пре-мРНК, транскрибирующаяся в ядре, подвергается сплайсингу при выходе из ядра и превращается в короткоживущую мРНК цитоплазмы. Предполагаем, что трансляция *всех* кодируемых в ядре индуцируемых светом белков и ферментов фотосинтеза осуществляется на этой цитоплазматической полицистронной мРНК. Предшественники таких белков подвергаются процессингу при их переносе в хлоропласт.

В схеме на рисунке 1 не отражено возможное участие в сигналинге пластохинонов [5], поэтому в модель дополнительно включили упрощенную схему цепи фотосинтетического транспорта электронов, представленную на рисунке 2.

Задача работы состояла в том, чтобы построить простую, удобную в работе и обладающую минимально необходимой информативностью модель ядерного управления структурой аппарата фотосинтеза, которая способна имитировать основные функции хлоропласта: биосинтез пигментного аппарата; поглощение и утилизацию ФАР; электронный транспорт от окисления воды до восстановления триоз в реакциях цикла Калвина; акцептирование  $\text{CO}_2$  с участием обеих субъединиц РБФКО; световую и углекислотную кривые фотосинтеза.

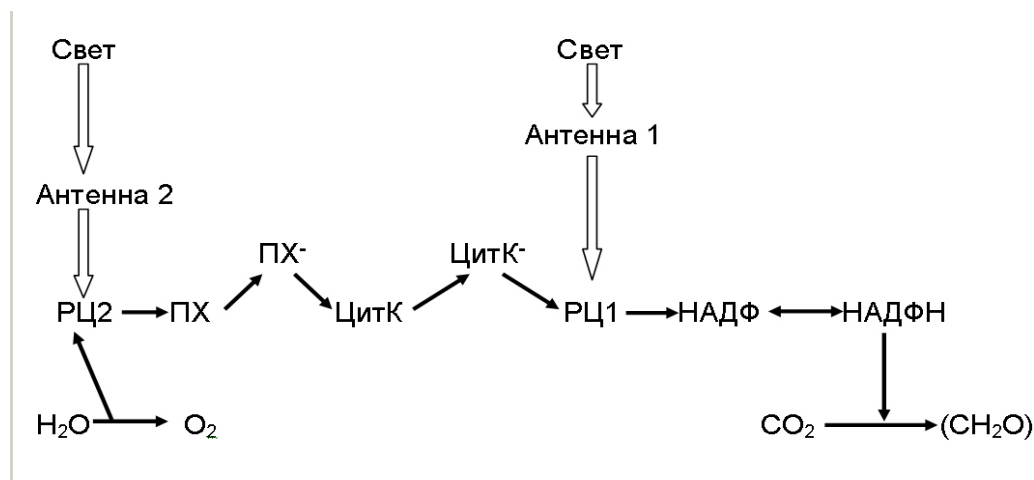
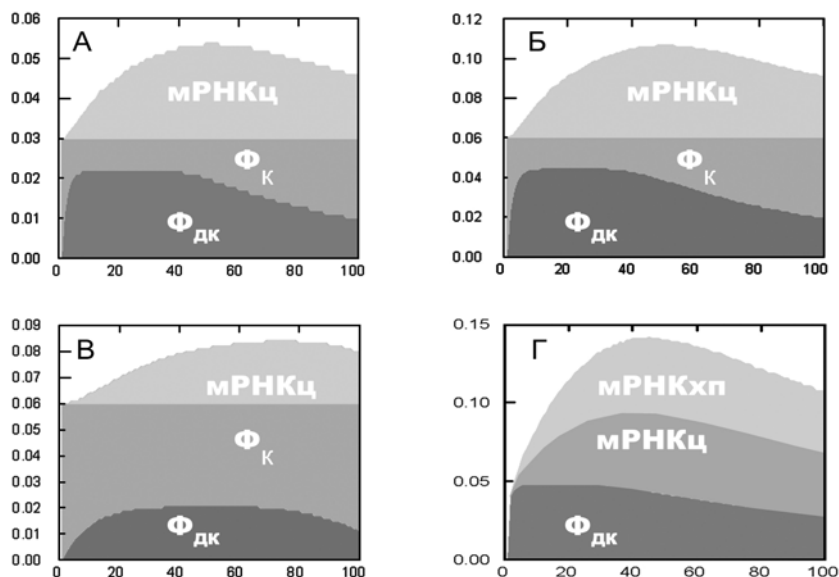


Рис. 2. Упрощенная схема фотосинтетического транспорта электронов, модель.

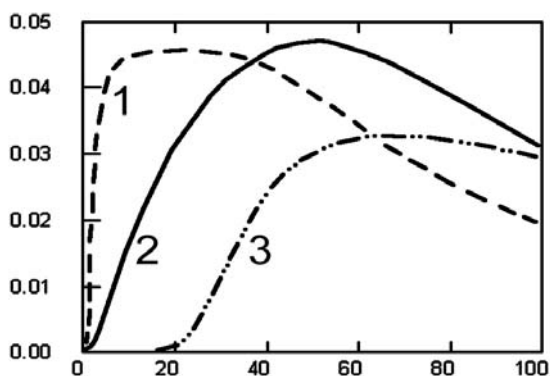
Для оценки поведения модели во времени, динамики модели, все реакции и взаимодействия описывали по правилам формальной химической кинетики. Активность ферментов представляли как произведение их количества и удельной активности, которую аппроксимировали параметром (константой скорости). При этом считали, что все ферменты работают на линейном участке кривой Михаэлиса-Ментен, т. е. в режиме реакции 1-го порядка по концентрации субстрата. Перенос молекул описывали диффузионным уравнением Фика (по градиенту концентрации). Получили систему из 32-х дифференциальных уравнений (из которых 21 нелинейное) и восьми простых алгебраических уравнений. Модель содержала 58 параметров, часть из которых идентифицировали по литературным данным, а остальные – методом подгонки. Для численного решения системы дифференциальных уравнений использовали метод Рунге-Кутты 4-го порядка. Величину шага по времени задавали произвольно при выборе начальных условий (интенсивности света –  $I_0$ , концентраций фитохрома –  $\Phi_0$  и концентрации  $CO_2$ ). Рабочую программу составили в интегрированной среде Турбо-Паскаль 7. Решения уравнений получали для всех 40 переменных. Для вывода решения группировали по три в желаемом порядке по выбору. Решения получали в графической форме на дисплее и выводили в файлы для длительного хранения. Численные эксперименты позволили получить информацию о характерных изменениях соотношений между элементами моделируемой системы во времени. Некоторые решения модели обсуждаются ниже. Эти решения представлены в относительных единицах для того, чтобы иметь возможность сравнивать несколько графиков в поле одного рисунка. Переход к абсолютным значениям можно реализовать вводом согласующих коэффициентов, сохранив особенности динамики поведения переменных.

Рисунки 3 А, Б и В отображают сохранение во времени суммарной концентрации обеих форм фитохрома и зависимость содержания цитоплазматической мРНК как от содержания активной формы фитохрома, так и от интенсивности света. Рисунок 3 Г иллюстрирует сходную динамику мРНК цитоплазмы и хлоропластов, которая определяется динамикой активной формы фитохрома.



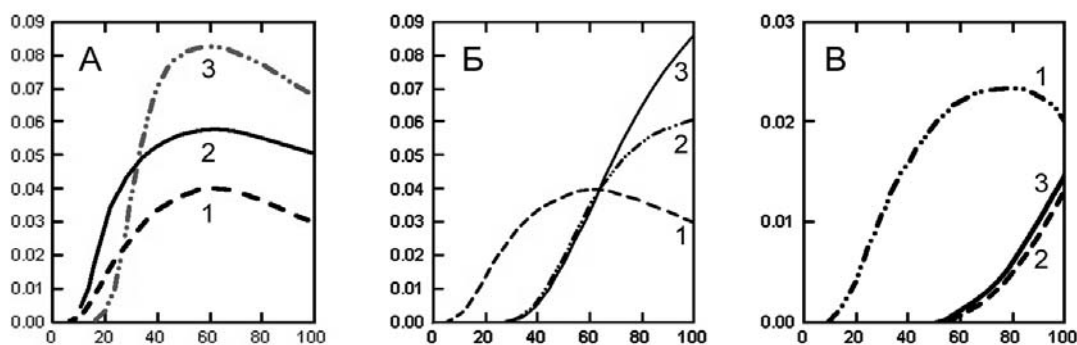
**Рис. 3.** Модельные графики площадей (отн. ед.), отображающих динамику активной ( $\Phi_{дк}$ ), неактивной ( $\Phi_{к}$ ) форм фитохрома и мРНК цитоплазмы (мРНКц): А – при  $\Phi_0=0,03$ , Б – при  $\Phi_0=0,06$ ; (А и Б – при освещенности  $I_0=320$  отн. ед.); В – то же, что и Б, при  $I_0=20$  отн. ед.; Г – динамика  $\Phi_{дк}$ , мРНК цитоплазмы и мРНК хлоропластов (мРНКхп). Оси абсцисс – число шагов по времени.

Из рисунка 4 следует, что уменьшение содержания активного фитохрома и мРНК синхронно нарастают концентрации хлорофилла, т. е. что фотостационарное состояние фитохрома в модельном эксперименте изменяется при накоплении хлорофилла.



**Рис. 4.** Динамика активного фитохрома (1), мРНК цитоплазмы (2) и уменьшенного в 10 раз содержания хлорофилла антенны ФС1 (3). Всё в отн. ед. Оси абсцисс – число шагов по времени.

Модельные решения по динамике хлорофилла и его предшественников (Mg-ППМЭ и протохлорофиллид), синтез которых осуществляется в хлоропластах комплексом ферментов, кодируемых в пластоме и синтезируемых в хлоропластах, представлены на рис. 5 А. Содержание Mg-ППМЭ и протохлорофиллида изменяется в соответствии с динамикой мРНК хлоропластов, а хлорофилла антенны фотосистемы 1 – по S-образной кривой. Такая динамика Mg-ППМЭ, возможно, выявленная в натурном эксперименте вызвала предположения об особой роли Mg-ППМЭ в сигналинге [4]. Динамика пула восстановленного пластохинона и НАДФН сопоставлена на рис. 5 Б и 5 В с изменением содержания Mg-ППМЭ при двух уровнях освещения. Модель воспроизводит изменения содержания как Mg-ППМЭ, так и восстановленных переносчиков электрона при изменении интенсивности света в соответствии с динамикой накопления хлорофилла (рис. 4).

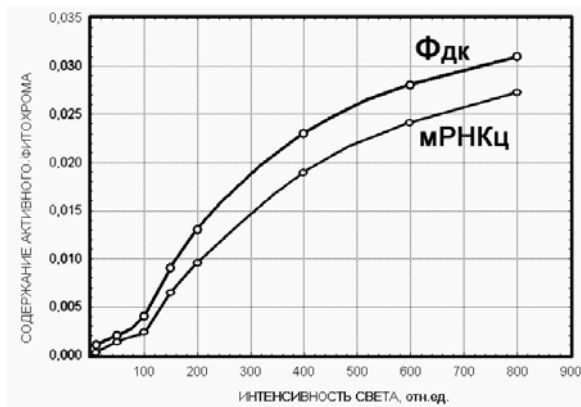


**Рис. 5.** Динамика элементов систем биосинтеза хлорофилла и электронного транспорта (отн. ед.). А – Mg-ППМЭ (1), протохлорофиллида (2) и хлорофилла фотосистемы-1 (3). Б – Mg-ППМЭ (1), восстановленного пластохинона (2) и НАДФН (3) при  $I_0 = 320$  отн. ед. В – то же, что и Б при  $I_0 = 20$  отн. ед. Абсциссы – число шагов по времени.

Обработка модельных решений, полученных при разных начальных значениях интенсивности света, позволила получить световые кривые изменения содержания активной формы фитохрома и мРНК цитоплазмы (рис. 6).

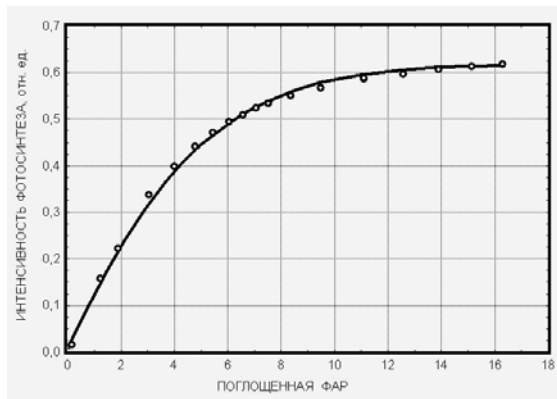
Разность значений  $\Phi_0$  и ординат кривой 1 соответствует содержанию неактивного фитохрома ( $\Phi_k$ ), поэтому кривая 1 отражает световую кривую фотостационарного состояния фитохрома. В натурном эксперименте измерение фотостационарного состояния фитохрома в живом листе весьма затруднительно. Кривая 2 позволяет оценить изменения скорости транскрипции пре-мРНК и образования цитоплазматической мРНК при изменениях освещенности. Обе кривые имеют сходную форму и стремятся к насыщению при высокой интенсивности света.





**Рис. 6.** Световые кривые содержания (отн.ед.) ФДК и мРНК цитоплазмы. Аппроксимация сплайном для 100-го шага по времени.

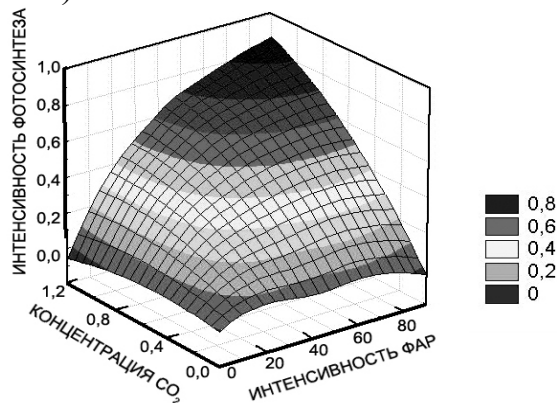
Модель позволяет достаточно просто построить световую кривую фотосинтеза по поглощенной ФАР (рис. 7). И эта задача в натурном эксперименте решается ценой больших затрат времени и труда, поскольку необходимо измерять не только пропускание света листом, но и альбедо листа во всём спектральном диапазоне ФАР.



**Рис. 7.** Световая кривая фотосинтеза по поглощенной ФАР (отн. ед.). Точки – решения модели для 100-го шага по времени, кривая линия – аппроксимация прямоугольной гиперболой.

Расположение расчетных точек на рис. 7 соответствует применяемой многими авторами полуэмпирической световой кривой фотосинтеза – прямоугольной гиперболе.

Модель позволяет без особых затруднений получать оценку интенсивности фотосинтеза при одновременных изменениях ФАР и концентрации  $\text{CO}_2$  в атмосфере путем построения трехмерной поверхности отклика (рис. 8).



**Рис. 8.** Поверхность отклика фотосинтеза (аппликата) на изменения интенсивности освещения (абсцисса) и концентрации  $\text{CO}_2$  (ордината) для 100-го шага по времени. Всё в отн. ед.

Таким образом, численные эксперименты с построенной моделью показали её познавательную ценность и что лежащая в основе модели рабочая гипотеза не опровергается их результатами. Это не следует рассматривать как строгое доказательство истинности предложенной гипотезы, однако, модель может служить основанием для постановки проверочных натуральных экспериментов с целью пополнения знаний о механизмах сигналинга между ядром и хлоропластами растительной клетки.

#### **Литература**

1. Вечер А.С. /Пластиды растений, их свойства, состав и строение. 1961. Мн. Изд-во АН БССР. 196 С.
2. Решетников В.Н. /Пластиды и клеточные ядра высших растений. 1982. Мн. Наука и техника. 128 С.
3. Strand A., Asami T., Alonso J., Ecker J.R., Beck Ch. F. // *Planta*, 2005. V. 222. N. 5. P. 734-756.
4. Chory J. // *Nature*, 2003. V. 421. P. 79-83.
5. Fey V., Wagner R., Brantigam K., Pfaanschmidt T. // *J. Exp. Bot.* 2005. V. 56. P.1491-1498.
6. Волоотовский И.Д. /Фитохром – регуляторный фоторецептор растений. 1992. Мн., Наука и техника. 168 с.
7. Møller S.G., Ingles P. J., Whitelam G.C. // *New Phytologist* (2002). V.154. P. 553-590.
8. Hisada A., Hanzawa H., Weller J.L., Nagatani A., Reid J.B., Furuya M. // *The Plant Cell*. 2000. V. 12. P.1063-1078.

#### **Summary**

A new conception is developed on the chloroplast – nucleus signaing mechanism based on the phytochrome photo stationary state shift caused by chlorophyll accumulation. The conception is verified using a dynamic mathematical model. Numeric experiment results are shown to imitate the behavior of photosynthesis system near to adequate.