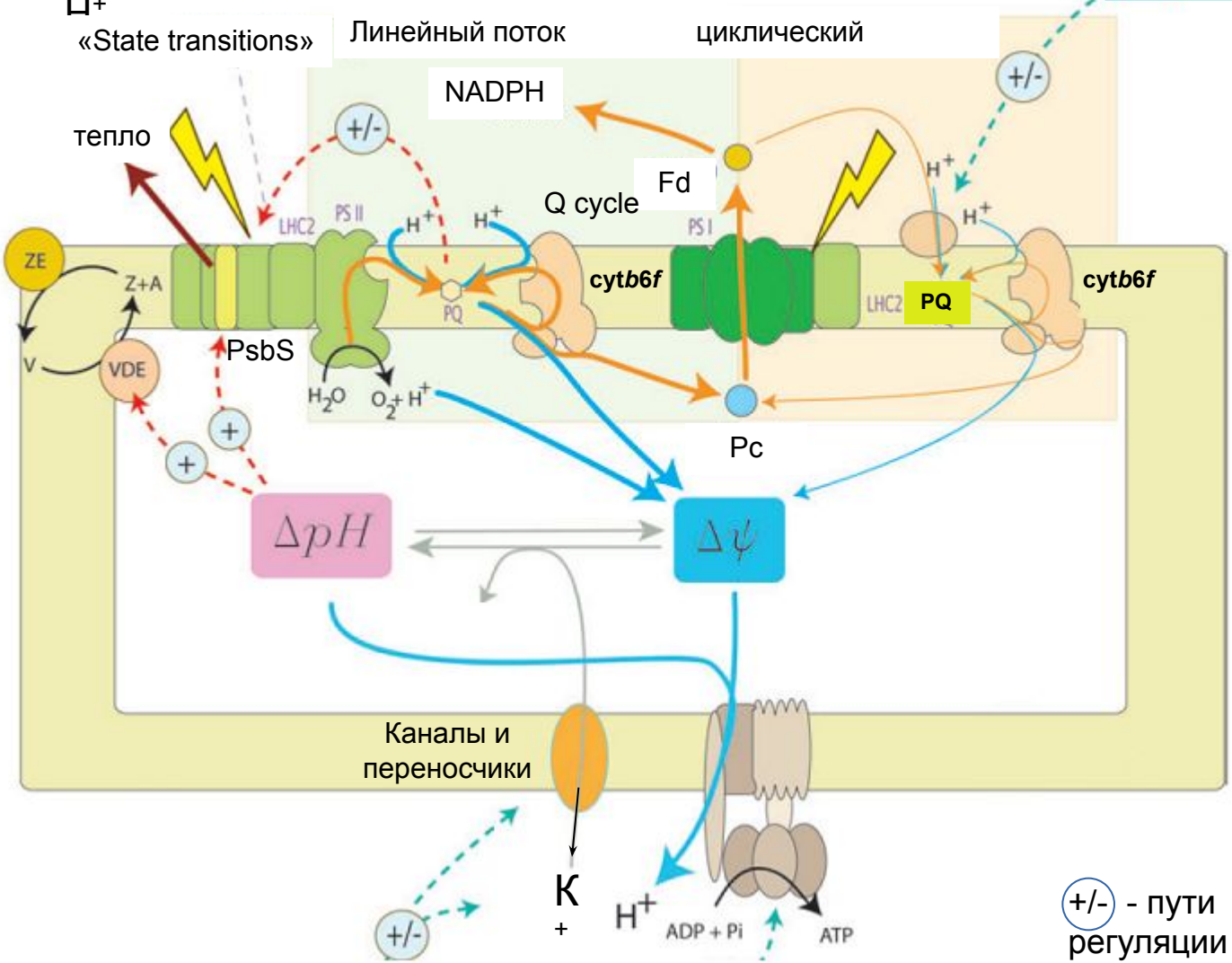
# Эл. поля в фотосинтетических мембранах

Сопряжение транспорта $e^-$ / $H^+$

(Avenson…Kramer, 2005)

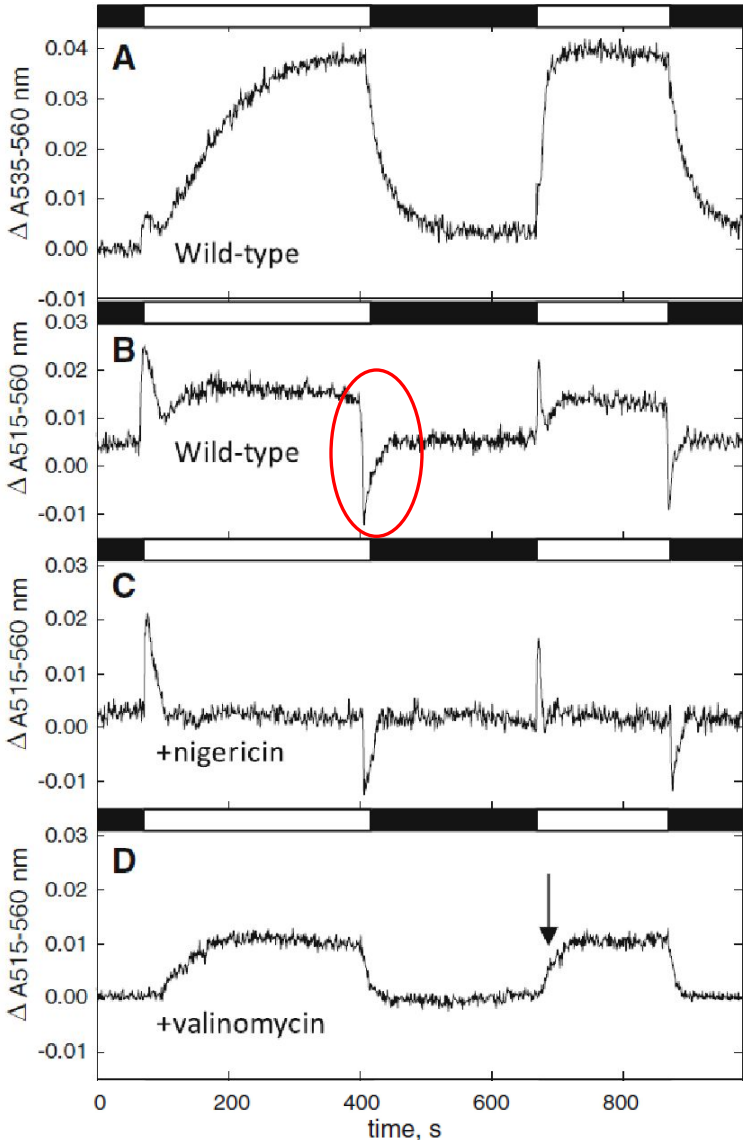
Redox?




+/- - пути регуляции

По этой схеме эл потенциал влияет только на H+-ATPазу. Так ли это, и как измеряют Δφ?

# Электрохромные изменения поглощения ΔA515-560 (спектральный сдвиг полосы поглощения каротиноидов в эл поле)




Johnson, Ruban 2013

Изменения «светорассеяния» ΔA535-560; служат показателем qE

«Электрохромные» изменения ΔA535-560

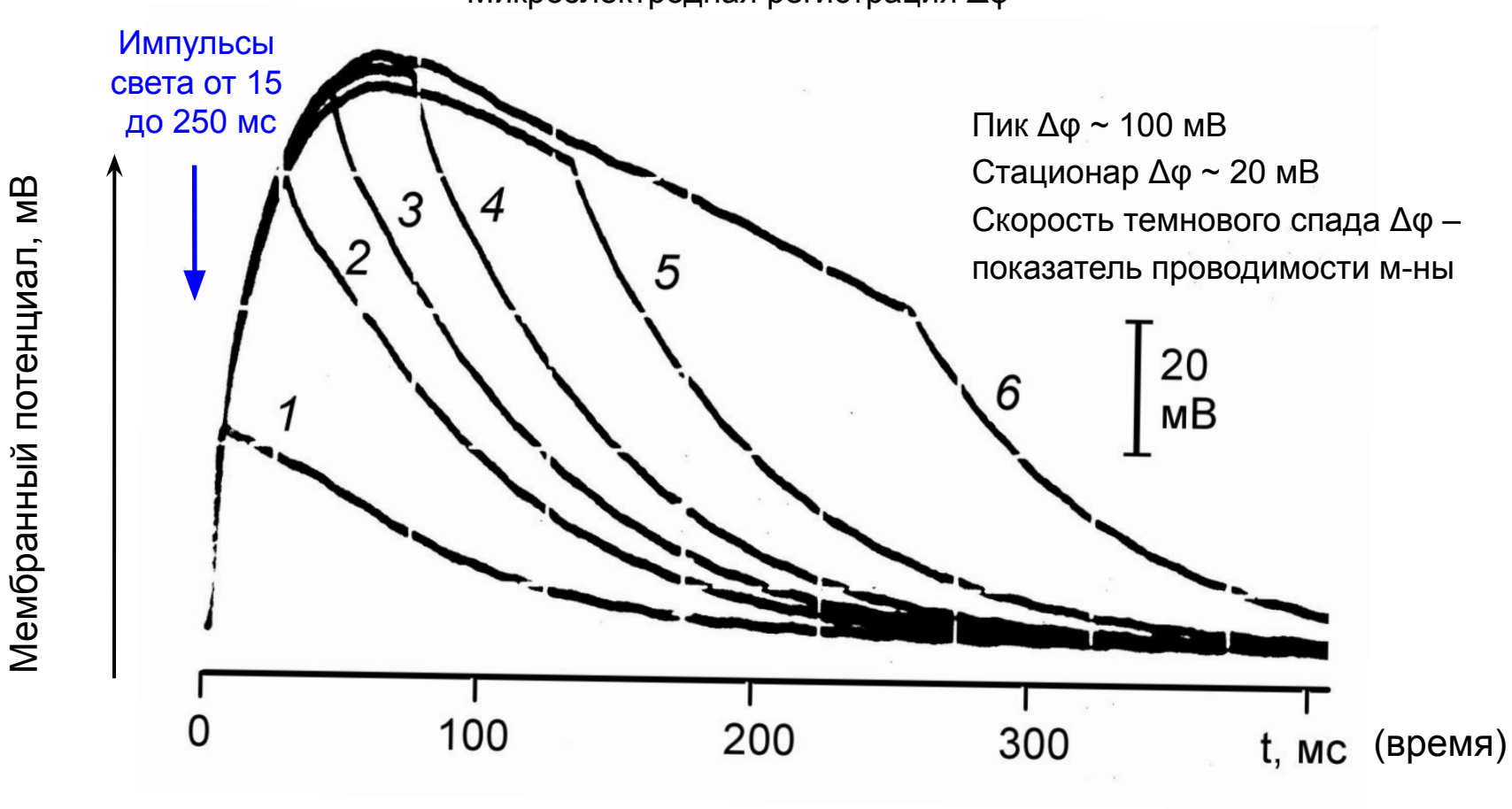
Контроль без ионофоров

+нигерицин (K+/H+ обмен)

+ валиномицин (повышает K+-проводимость, снимает Δφ

## Фотогенерация мембранного потенциала в тилакоидах

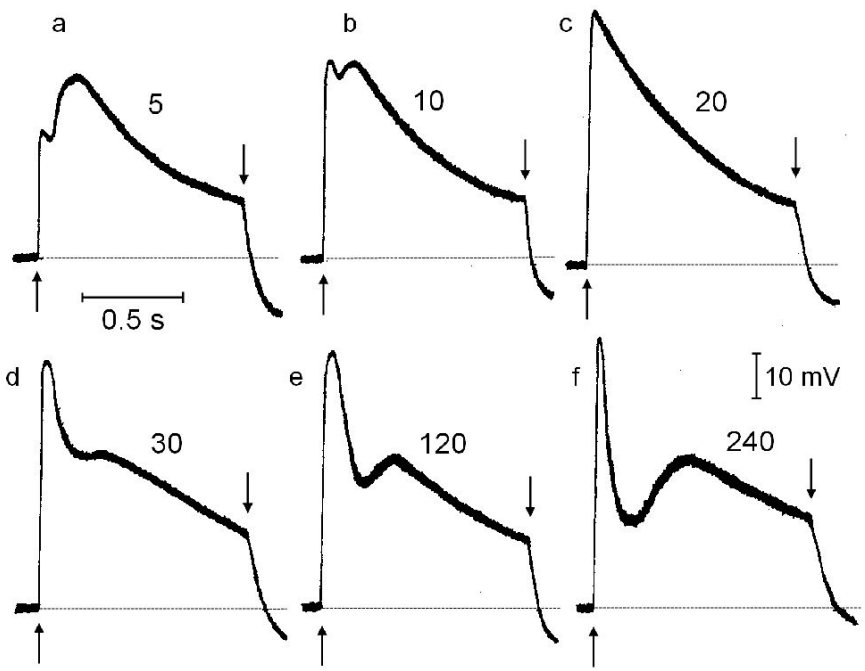
Микроэлектродная регистрация Δφ




Напряженность эл поля 0.1 В / 5 $10^{-7}$ см = 2 $10^{5}$ В/см
Начальные стадии ф-за протекают в эл поле; напряженность меняется во времени.
Амплитуда изменений Δφ близка к амплитуде потенциала действия возбудимых м-н.

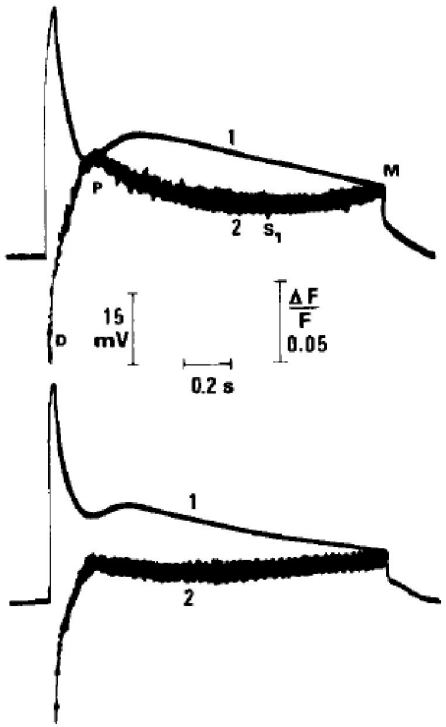
Кинетика потенциала in vivo зависит от длительности предшествующего периода темноты

**Зависимость фотогенерации Δφ в Хп-те от длительности предшествующей темновой адаптации (в секундах)**




Темновая адаптация инактивирует перенос электронов на акцепторной стороне ФС1: потенциал быстро спадает после пика из-за нехватки акцепторов для ФС1

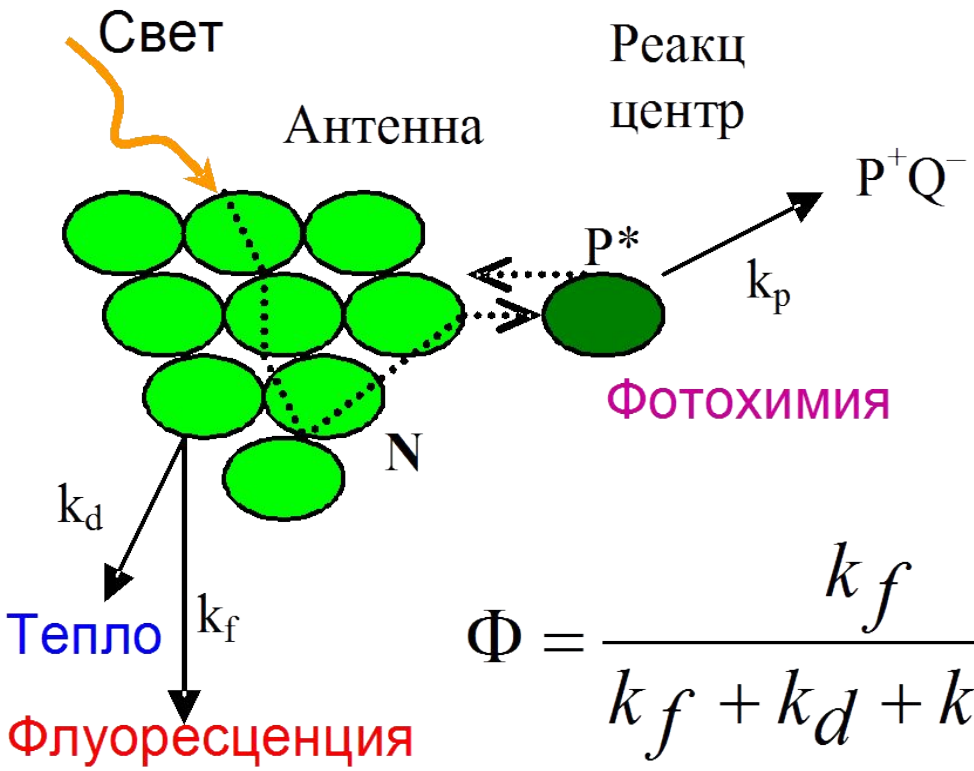
**Одновременная регистрация Δφ и флуоресценции Хп-тов после разных периодов темноты**




Фотоактивация переноса электронов на акцепторной стороне ФС1 вызывает временное окисление QA (спад фл-ции) синхронное с возрастанием Δφ

Влияет ли Δφ на ф-с поток электронов и флуоресценцию Хл?

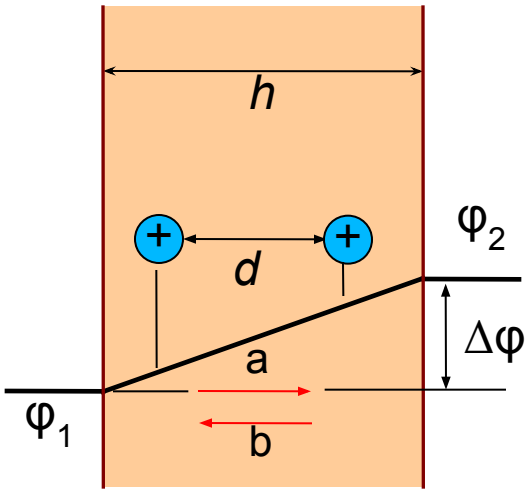
**Влияние эл поля на ф-с транспорт электронов.**
Пути утилизации и потерь световой энергии в фотосинтетическом аппарате




$$\Phi = \frac{k_f}{k_f + k_d + k_p / N}$$

*N* – число молекул Хл антенны в расчете на молекулу хлорофилла РЦ
Существует промежуточное состояние, $P^+$ $Pheo^-$ энергия к-рого чуть ниже чем P*, но существенно выше чем энергия состояния $P^+Q^-$.

# Влияние эл. поля на перенос заряда в мембранах

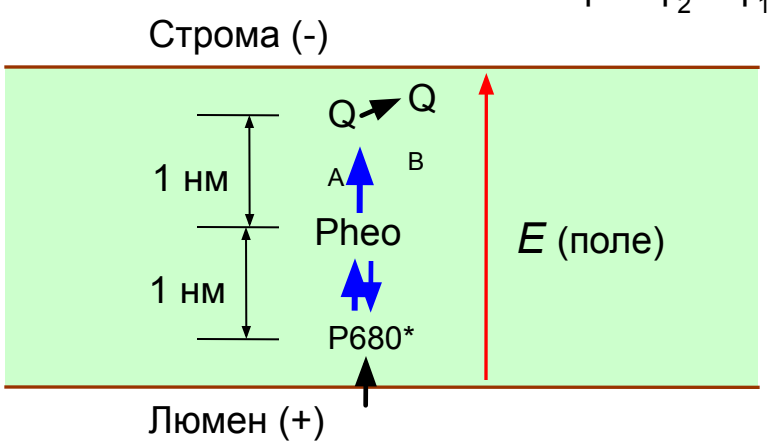



$$\Delta E = \boxed{\phantom{xxxxxxxxxxxxxxxxxxxx}}$$

$$p = \frac{a}{a+b} = \frac{1}{1+b/a} = \frac{1}{1+\exp\left(\frac{-\Delta E}{RT}\right)}$$

$$\Delta E = -RT \ln K$$

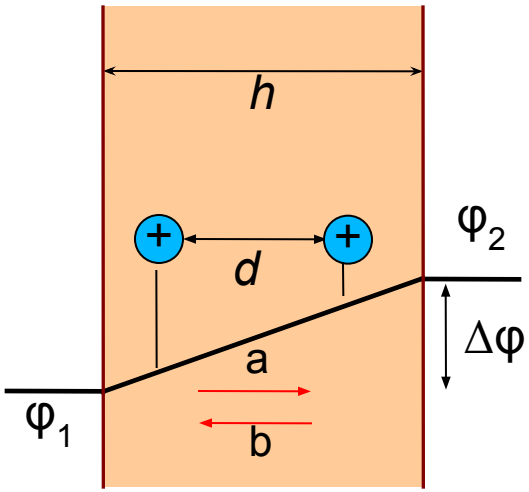
*a, b* – константы скорости прямого и обратного переноса заряда
*b/a* – константа равновесия
$\Delta\varphi = \varphi_2 - \varphi_1$




Разность энергий между состояниями P* и $P^+Pheo^-$ составляет 40–50 мэВ. Поэтому равновесие чувствительно к сдвигам Δφ.

Диурон (DCMU) блокирует перенос от $Q_A$ на $Q_B$
Гидроксиламин тормозит приток е к P680.
Диурон восстанавливает, а ГА – окисляет $Q_A$.

# Влияние эл. поля на перенос заряда в мембранах



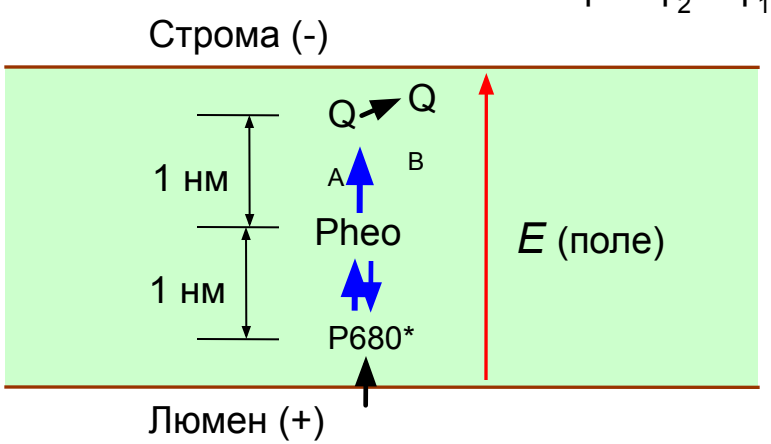

$$\Delta E = zF \cdot \Delta\varphi \frac{d}{h}$$

При наличии Δφ энергия иона зависит от его положения в м-не

$$p = \frac{a}{a+b} = \frac{1}{1+b/a} = \frac{1}{1+\exp\left(\frac{-\Delta E}{RT}\right)}$$

$$\Delta E = -RT \ln K$$

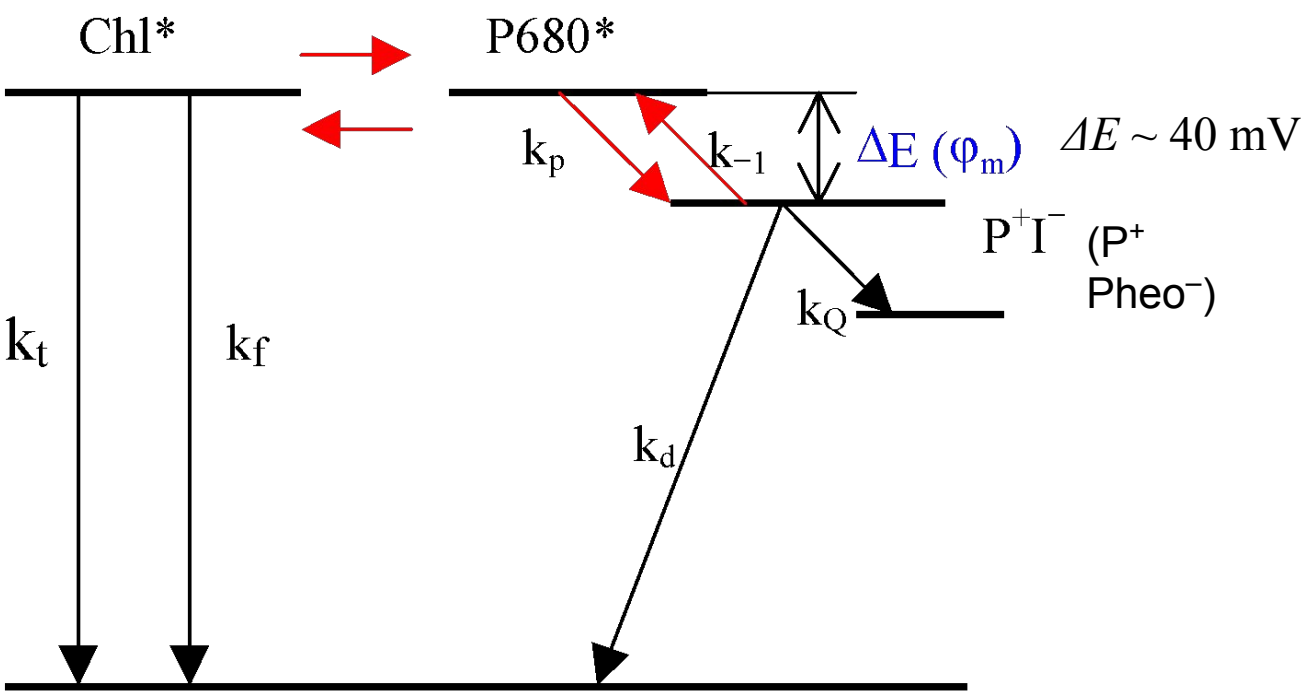
*a, b* – константы скорости прямого и обратного переноса заряда
*b/a* – константа равновесия
$\Delta\varphi = \varphi_2 - \varphi_1$




Разность энергий между состояниями P* и $P^+Pheo^-$ составляет 40-50 мэВ. Поэтому равновесие чувствительно к сдвигам Δφ.

Диурон (DCMU) блокирует перенос от $Q_A$ на $Q_B$
Гидроксиламин тормозит приток е к P680.
Диурон восстанавливает, а ГА – окисляет $Q_A$.

## Влияние эл. поля на разделение и рекомбинацию зарядов в тилакоидной мембране: Модель обратимой радикальной пары




$k_t$ – диссипация в тепло (thermal)
$k_f$ – флуоресценция
$k_d$ – рекомбинация зарядов без излучения
$k_Q$ – перенос электрона на акцептор QA

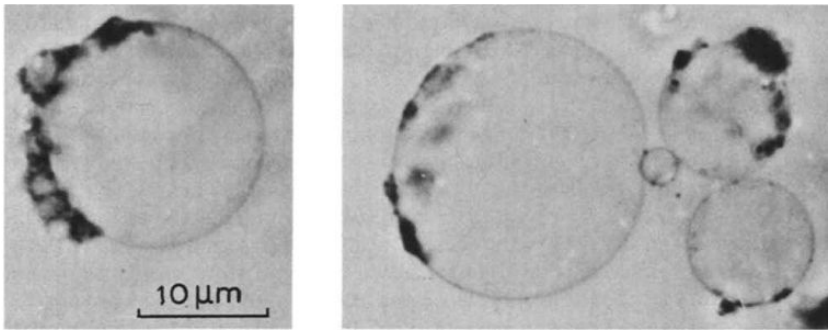
Красными стрелками показаны стадии, рассматриваемые как равновесные (скорости этих стадий выше, чем для р-ций $k_Q$, $k_d$ и $k_f$).

**Влияние локального эл поля $Q_A$** на кривые потенц энергии Хл антенны и радикальной пары $P^+I^-$

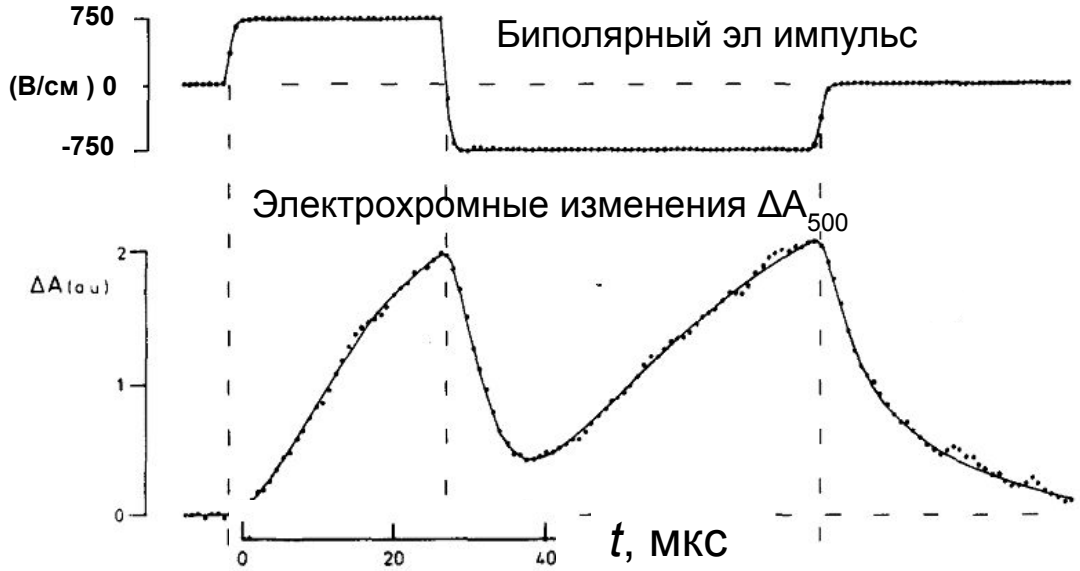
Schatz et al. 1988

Есть сходство с динамич. профилями энергии в канале (присутствие иона в соседней потенц. яме повышает высоту энерг барьера)

**Набухшие тилакоиды** – модель для изучения влияния эл поля на оптич св-ва пигментов и перенос электронов

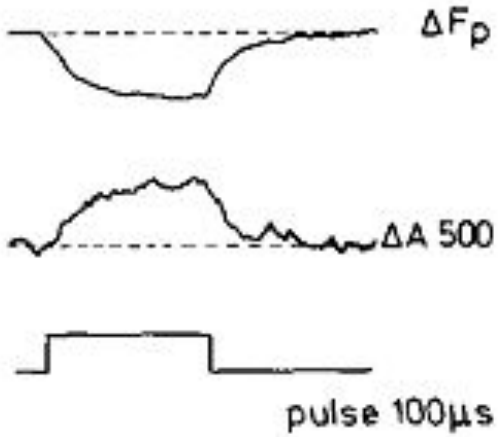



Блебы (De Grooth et al. 1980)

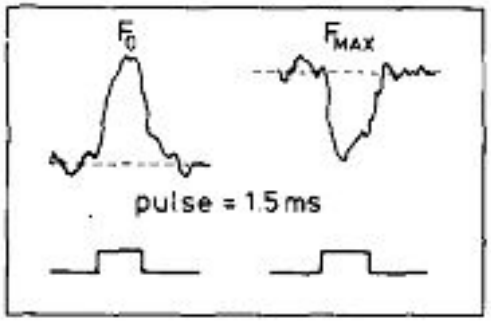


## Влияние эл поля на тилакоиды, набухшие в гипотонической среде

Изменения фл-ии под действием эл поля в присутствии диурона и гидроксиламина

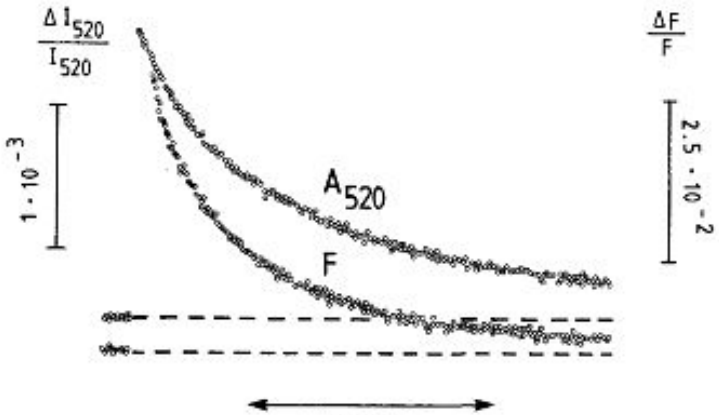



Meiburg et al. 1983




Интерпретация осложнена

## Измерения на целых листьях при генерации Δφ фотосистемой 1

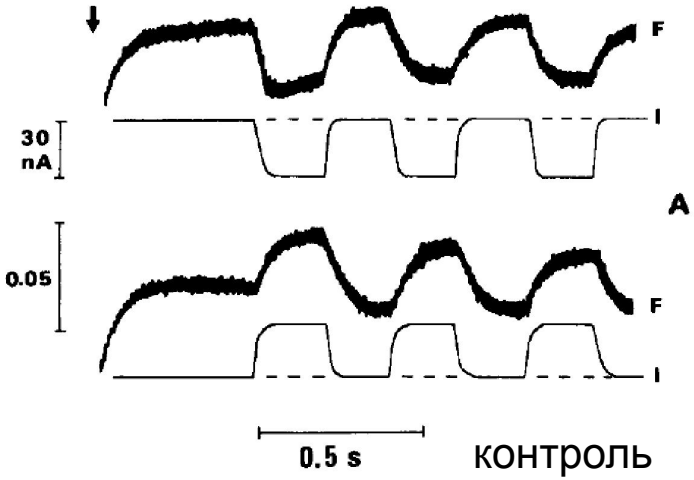


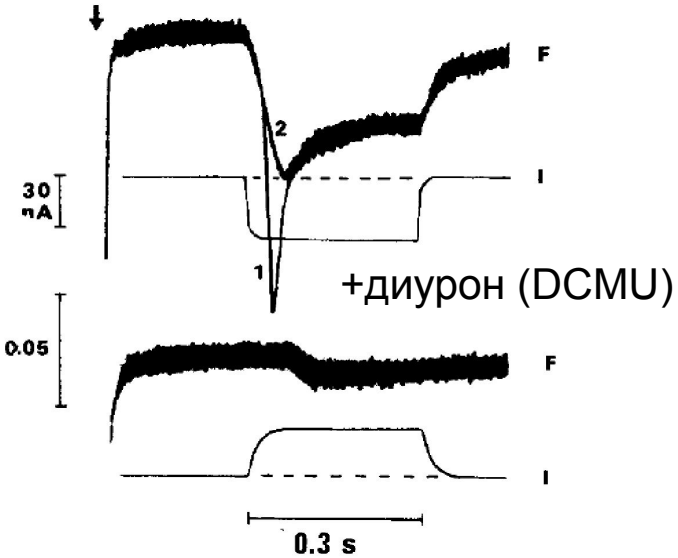

20 мс

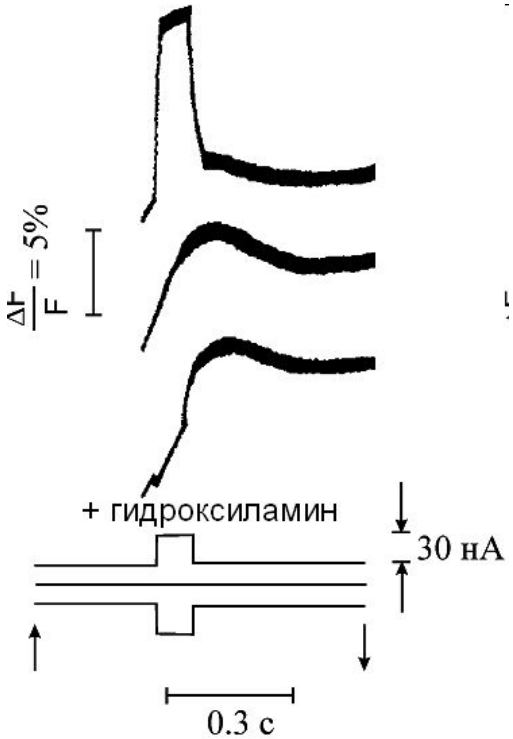
Dau et al. 1991

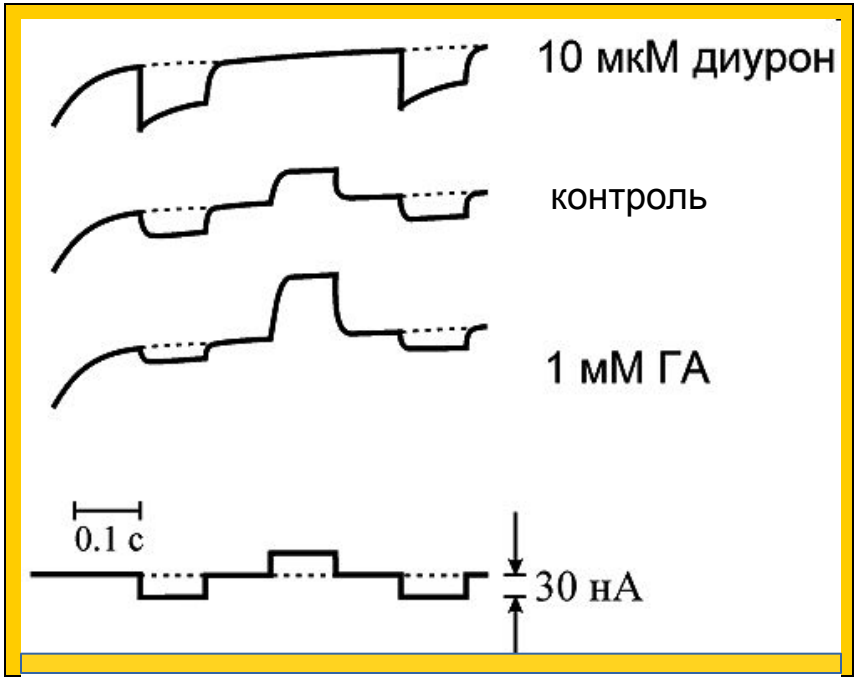
Изменения поглощения $A_{520}$ (показатель эл. потенциала) и выхода флуоресценции хлорофилла *F* в ответ на вспышку дальнего красного света (ДКС), который не вызывает восстановления $Q_A$). *ΔF* ~ 5.4% на 10 мВ.

Изменения флуоресценции хлоропласта при импульсах тока разной полярности и разном состоянии акцептора $Q_A$ (Biochim. Biophys. Acta 850)

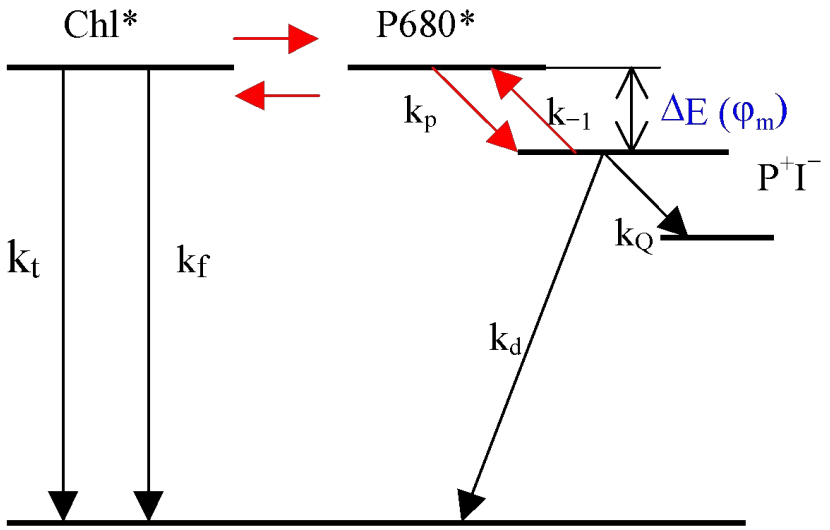


## Влияние эл. поля на разделение и рекомбинацию зарядов в тилакоидной мембране




Влияние Δφ вызвано изменением отношения констант $k_p$ и $k_{-1}$ между P680 и Pheo, а также изменением вероятности рекомбинации восст. Phe с окисл. P680 ($k_d$). В РЦ, получивших энергию кванта, состояния $P680^+$ $Феo^-$ и P680* быстро уравновешиваются Вероятности состояний $P680^+$ $Pheo^-$ и P680* обозначим *x* и *y*.

$$x/y = k_p/k_{-1}$$

## Зависимость фл-ции хлорофилла от потенциала φ на м-не тилакоида

$$\frac{x}{y} = \frac{k_p}{k_{-1}} = \exp\left(-\frac{\varphi - \varphi_o}{RT/F}\right)$$

Влияние потенциала φ на относительную заселенность (вероятность) состояний P680* и P+Pheo- ($\varphi_o$ – редокс потенциал P+Pheo- при φ = 0)

$$\Phi_{фл} = \frac{k_f}{k_f + k_t + \frac{k_d}{N}\frac{x}{y} + \frac{k_Q}{N}\theta\frac{x}{y}}$$

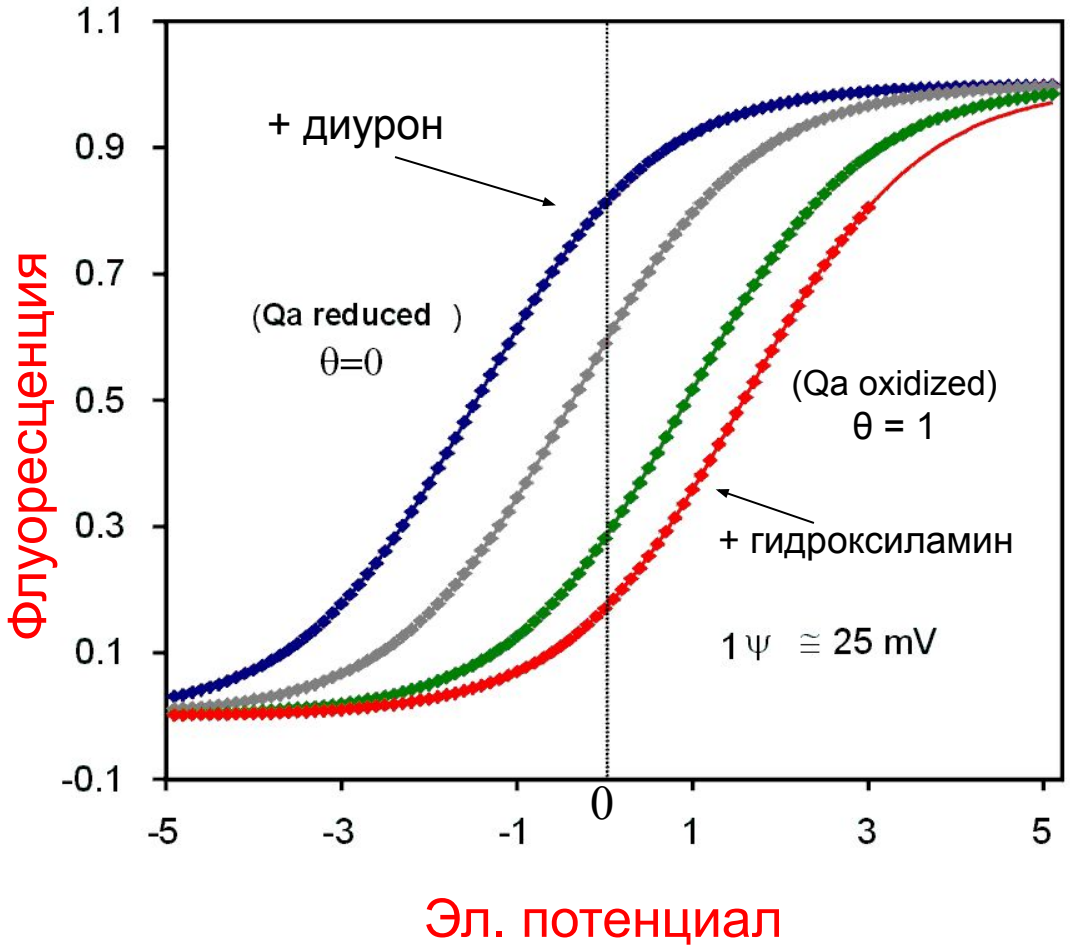
Зависимость выхода фл-ции от заселенности уровней в обратимой радикальной паре *x / y* и редокс состояния акцептора QA *(θ)*

$\theta -$ доля окисл. формы акцептора $Q_A$

$$\Phi_{фл} = \frac{1}{1 + \frac{k_t}{k_f} + \frac{k_d}{k_f N}e^{\psi_0 - \psi} + \frac{k_Q}{k_f N}\theta e^{\psi_0 - \psi}}$$

Зависимость выхода фл-ции от разности потенциалов φ на участке мембраны между P680* и P+Pheo- .
Величина θ – параметр: 0, 0.1, 0.5, 1.0

Расчетные зависимости переменной флуор-ции от мембр потенциала при разных значениях θ (0, 0.1, 0.5 и 1.0). Разность пот-лов - в безразмерных единицах (RT/F)

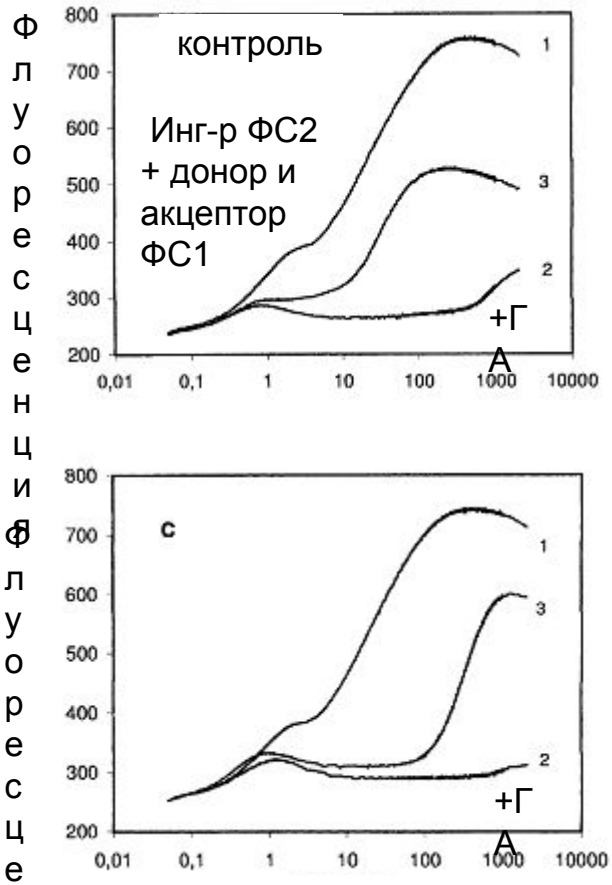



В опытах с генерацией диф. потенциала при солевом «ударе» фл-ция сдвигается на ~10% при сдвиге Δφ на 100 мВ.

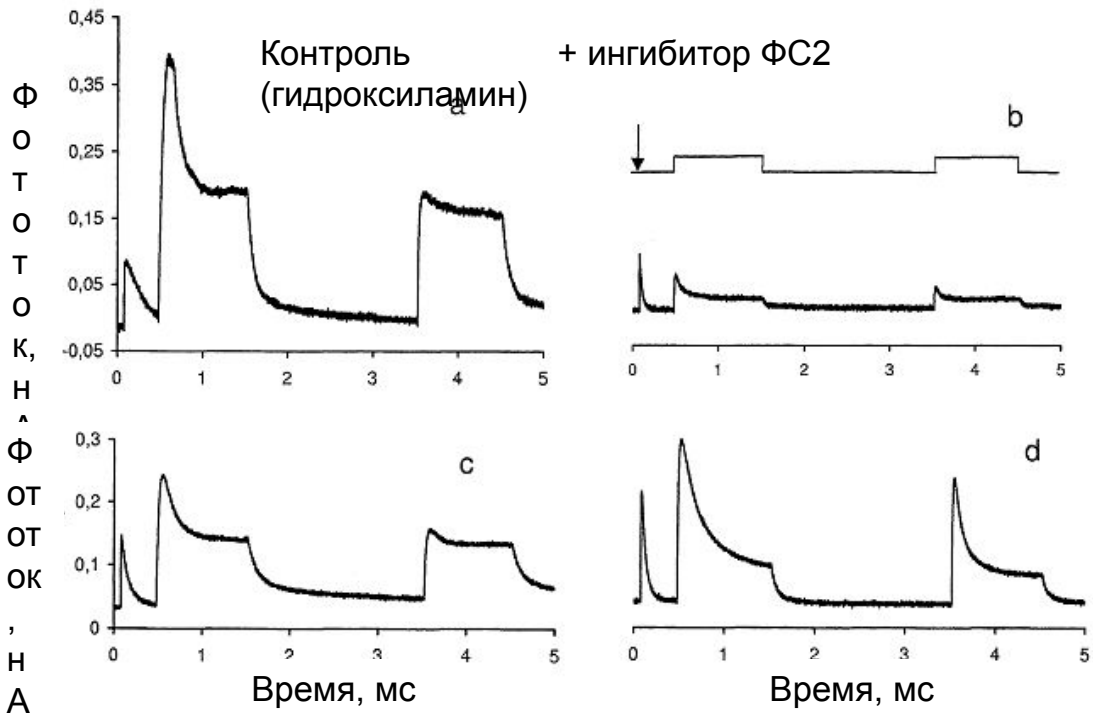
Модель объясняет, почему биполярные импульсы тока вызывают асимметричные или симметричные сдвиги флуоресценции при разном состоянии QA, т.е.
- в норме (на свету),
- в присутствии диурона,
- в среде с гидроксиламином

# Зависимость флуоресценции хлорофилла от электрогенных процессов в ФС1

**Флуоресценция изолир. Хп**



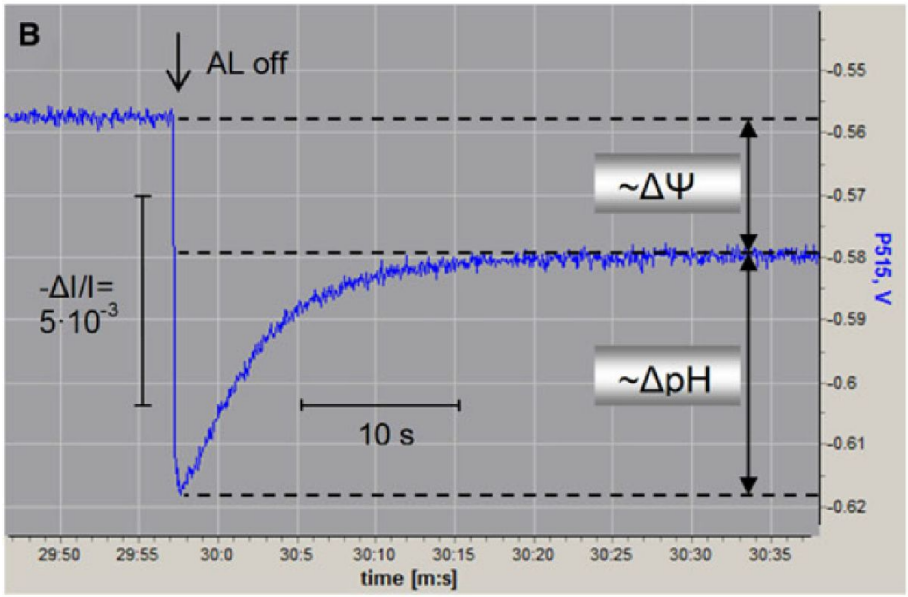

**Фототок в изолированных хлоропластах**




Гидроксиламин + донор и акцептор для ФС1

(ТМФД / метилвиологен; восст. ДХФИФ / МВ)

Эл потенциал Δφ и градиент протонов (ΔpH) оказывают регуляторное действие на функции хлоропласта: как оценить их вклад в $\Delta\mu_H$?

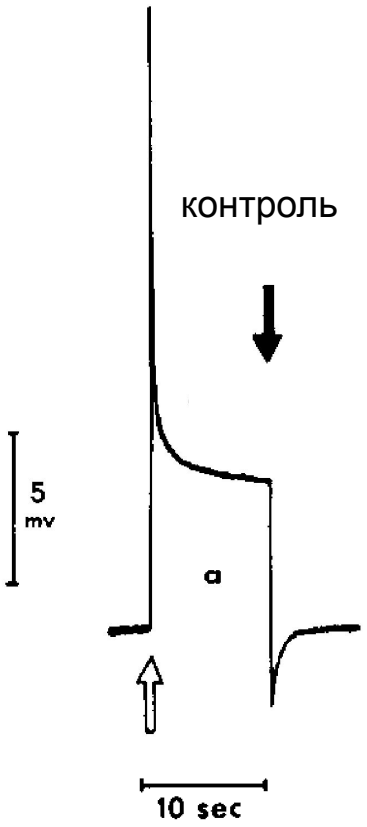



Изменения поглощения в области 515 нм (электро-хромные изменения) служат показателем Δφ. Реакция Δφ на выключение света позволяет разделить эти компоненты.

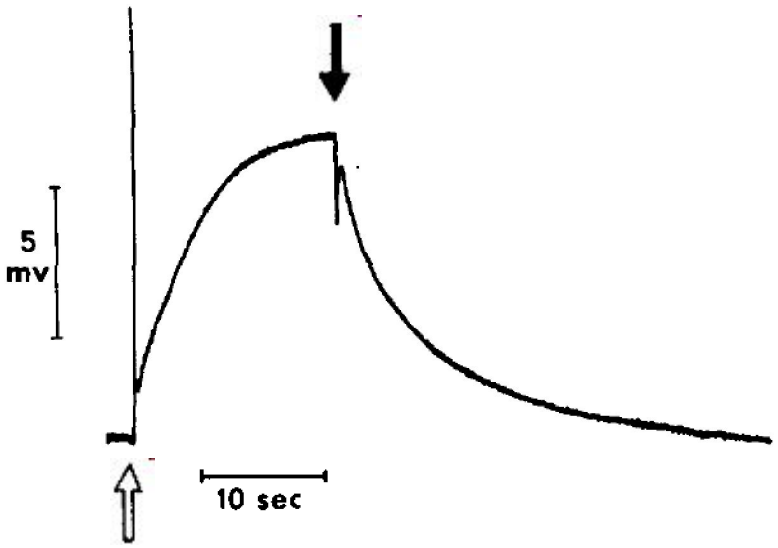
В данном примере на долю Δφ приходится ~40%.

Есть ограничения. Такой анализ применим при условии постоянства и преобладания $H^+$-проводимости мембраны. Если $H^+$-проводимость подавлена ингибитором (DCCD), отрицательный сдвиг потенциала не возникнет (низкая $H^+$-проводимость, малое $P_H$).

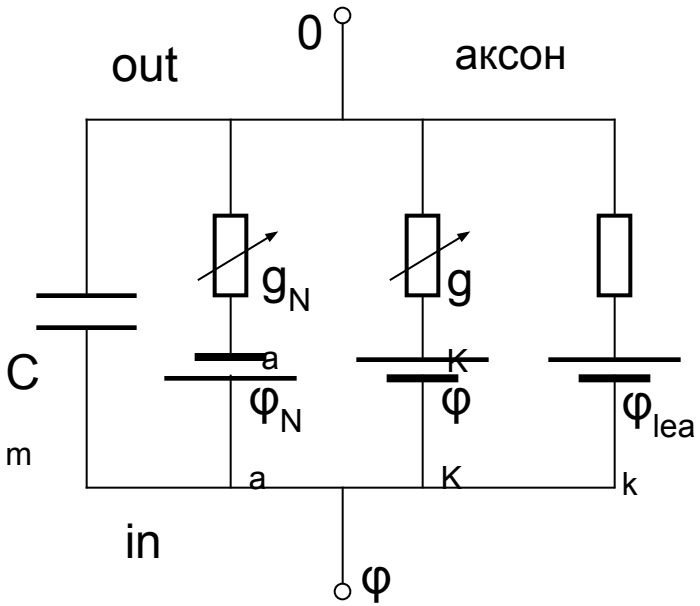
Постсветовые потенциалы могут отличаться по знаку

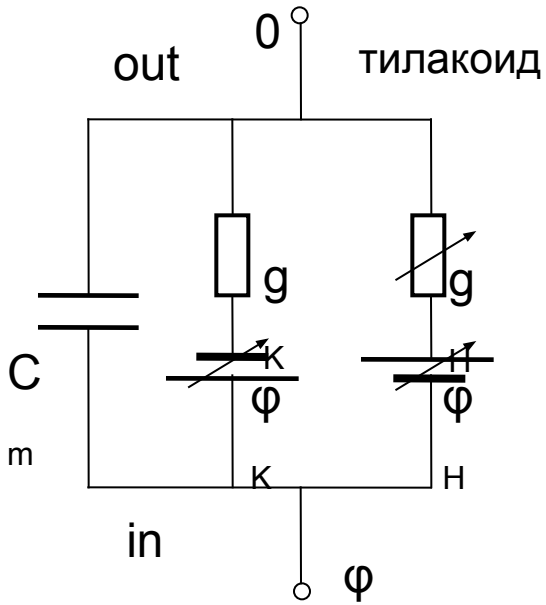



10 mM KCl + 0.2 mM valinomycin



Отличие в эквивалентных схемах для аксона и тилакоидной м-ны



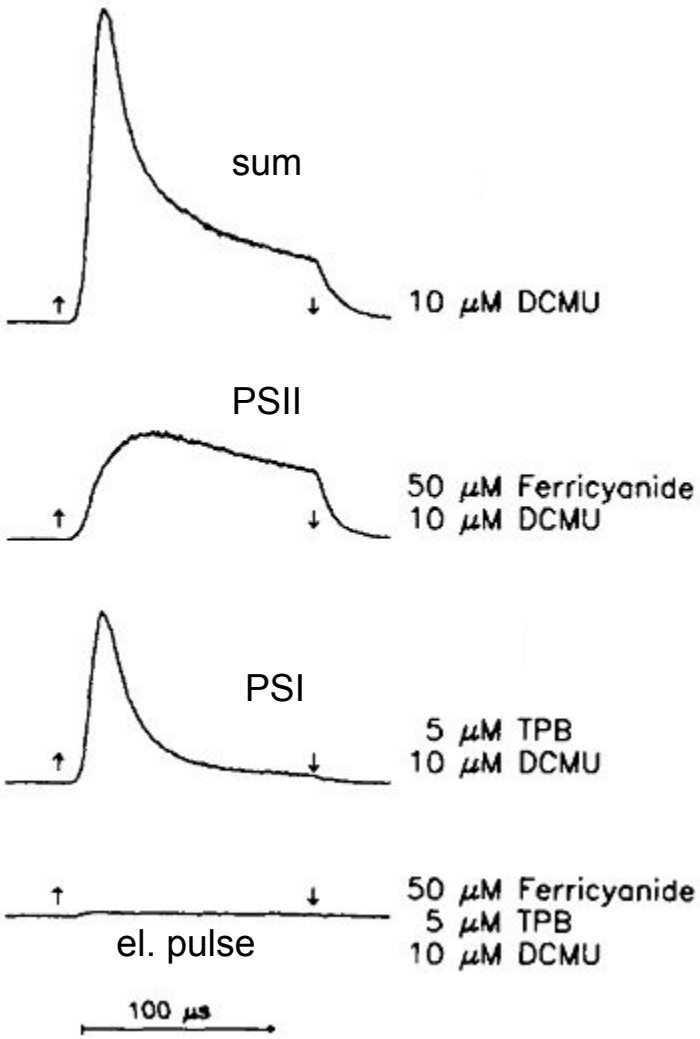




За время ПД ~ 1 мс конц-ии ионов внутри и снаружи не изменяются,
значения эдс $\varphi_{Na}$ и $\varphi_K$ – константы,
так как уровни $K^+$ и $Na^+$ высоки: $[K^+]i$ ~ 100 мМ и $[Na^+]i$ ~ 10 мМ.

Конц-ия $H^+$ на свету в люмене возрастает в сотни раз, а в строме снижается.
Это меняет значения эдс $\varphi_H$ и проводимости $g_H$.

При низких $[K^+]$ в строме и люмене (валиномицин + низкая $[K^+]$ в среде)
меняется также эдс для $K^+$. Накопление $K^+$ в строме и диффузия $K^+$
в люмен создают положит. эдс $\varphi_K$.

Электролюминесценция осмотически набухших хлоропластов (блебы)
(Vos, van Gorkom 1988)




Измерение через 10 мс после вспышки

Феррицианид окисляет P700 и устраняет разделение зарядов в ФС1

Тетрафенилбор – донор для ФС2 (препятствует рекомбинации зарядов в ФС2)

Быстрая стадия ЭЛ связана с ФС1

Можно разделить ЭЛ от ФС1 и ФС2

ЭЛ в ФС1 обусловлена рекомбинацией между P700+ и акцепторами FA- или FB-

По данным измерения температурных зависимостей ЭЛ ФС1 энергия активации равна 460 мэВ.

ЭЛ ФС2 колеблется в зависимости от номера вспышки с периодом 4. Т.е. в рекомбинации зарядов участвуют состояния Z+ (КВК) и QA-.