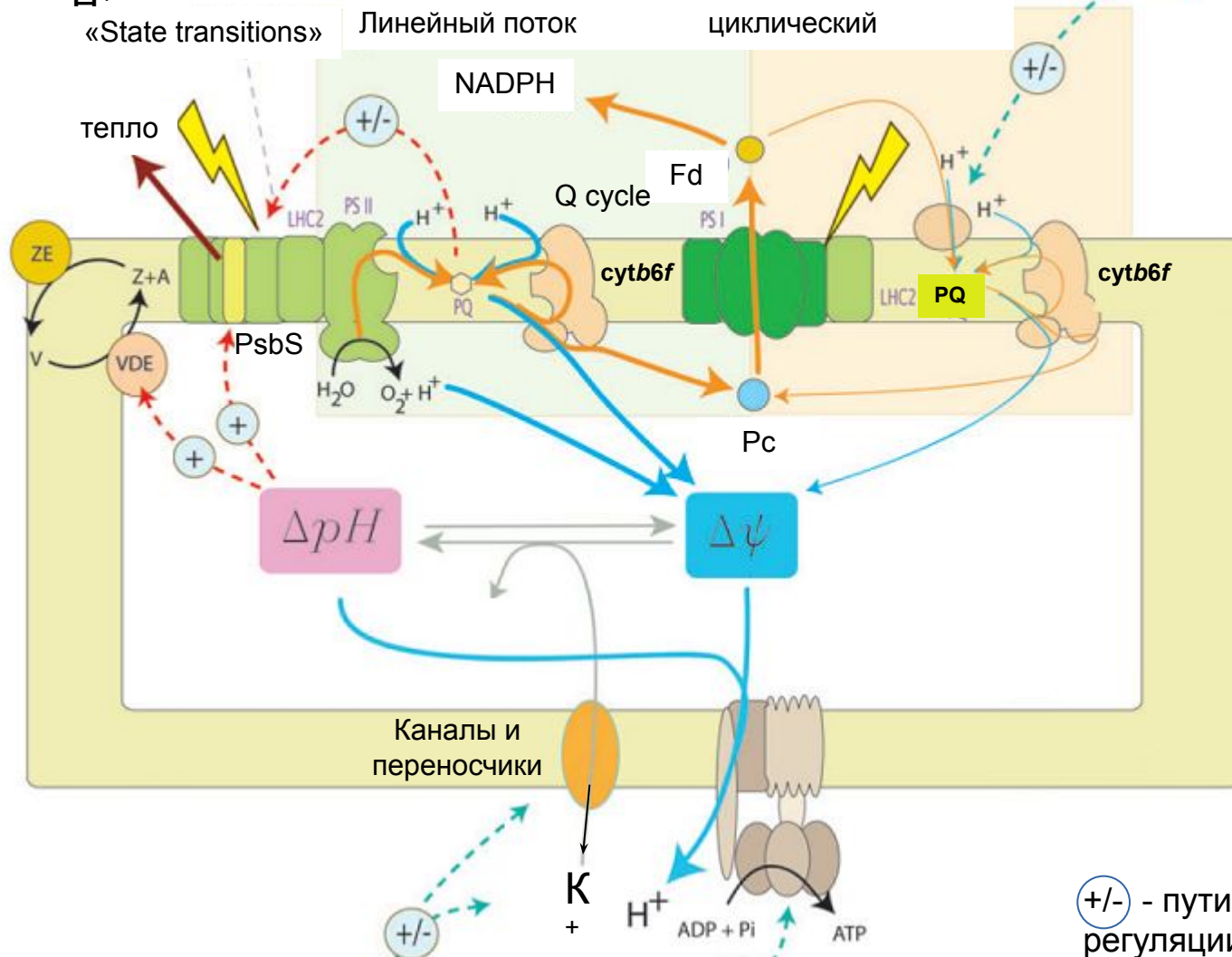


Эл. поля в фотосинтетических мембранах

Сопряжение транспорта e^- / H^+
«State transitions»

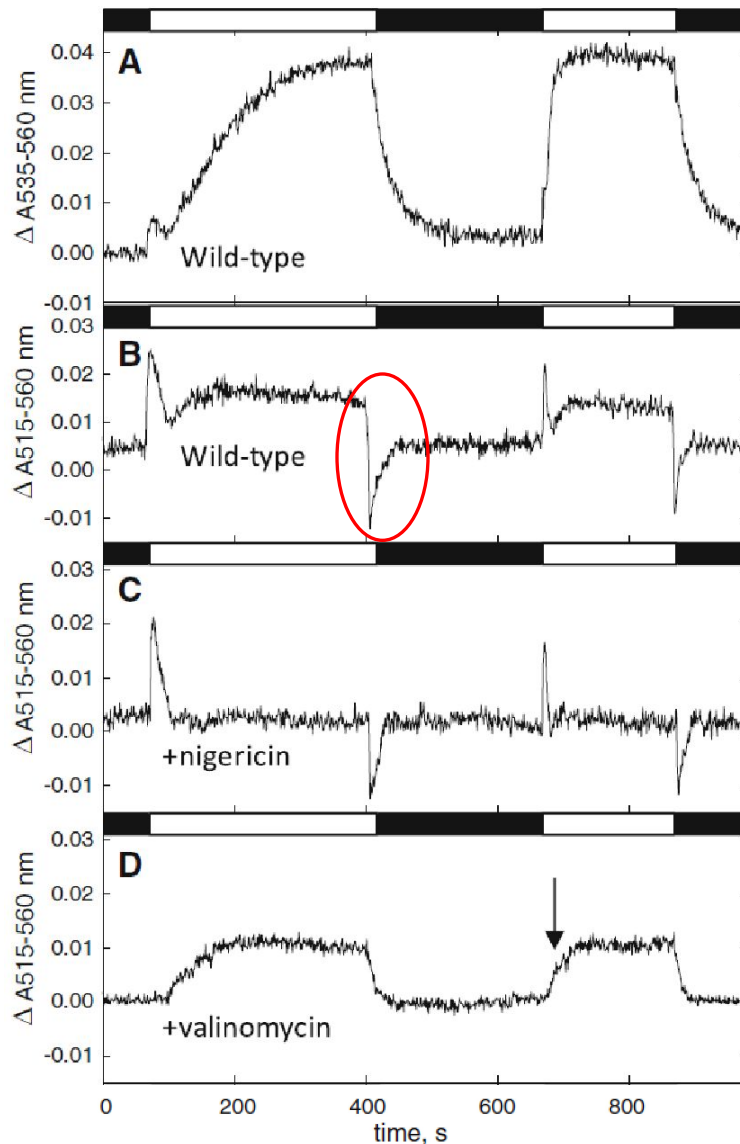
(Avenson...Kramer, 2005)

Redox?



По этой схеме эл потенциал влияет только на H^+ -АТФазу. Так ли это, и как измеряют $\Delta \psi$?

Электрохромные изменения поглощения $\Delta A_{515-560}$ (спектральный сдвиг полосы поглощения каротиноидов в эл поле)



Johnson, Ruban 2013

Изменения «светорассеяния» $\Delta A_{535-560}$; служат показателем qE

«Электрохромные» изменения $\Delta A_{515-560}$

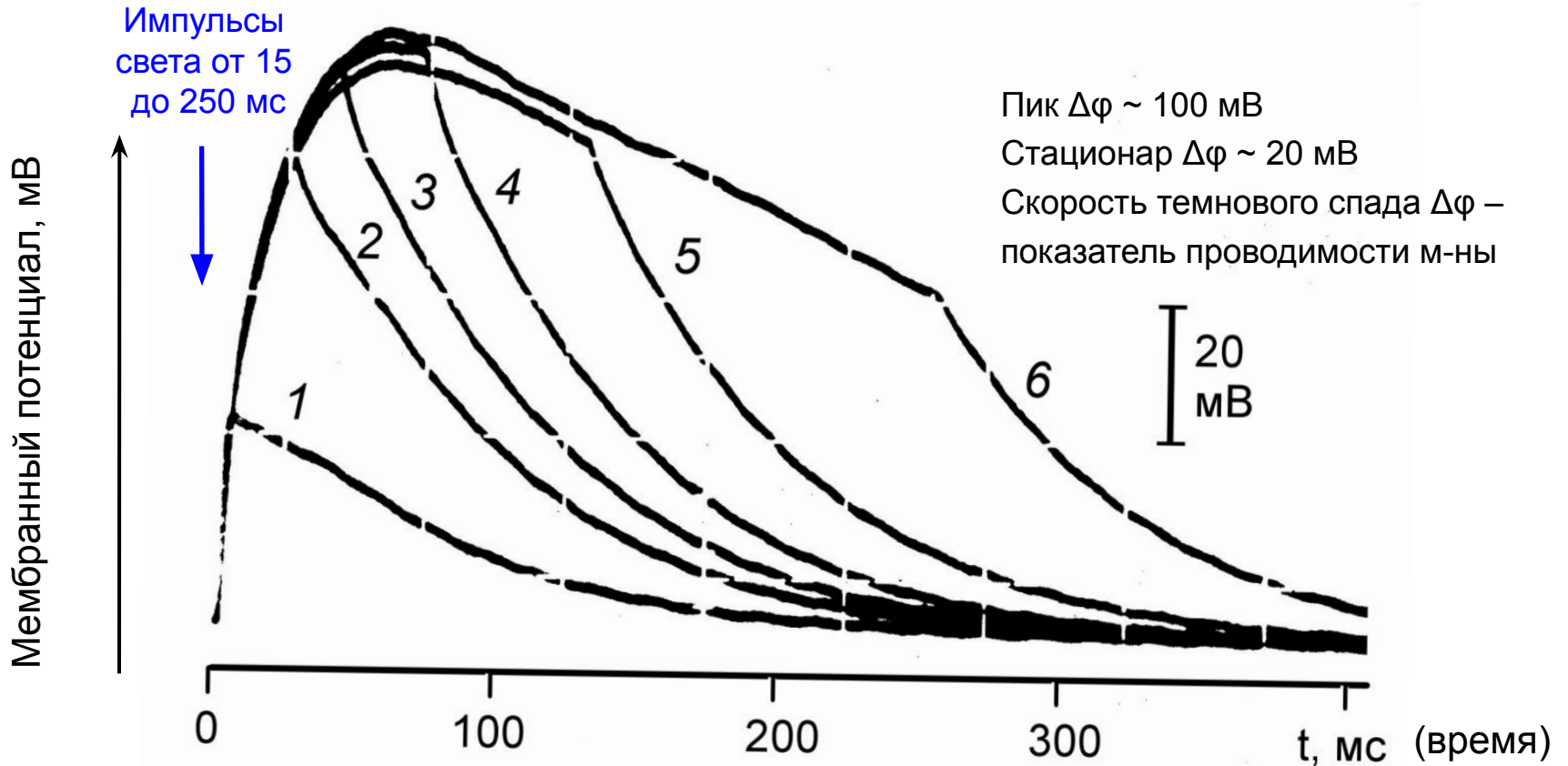
Контроль без ионофоров

+нигерин (K⁺/H⁺ обмен)

+ валиномицин (повышает K⁺-проводимость, снимает $\Delta\phi$)

Фотогенерация мембранного потенциала в тилакоидах

Микроэлектродная регистрация $\Delta\phi$



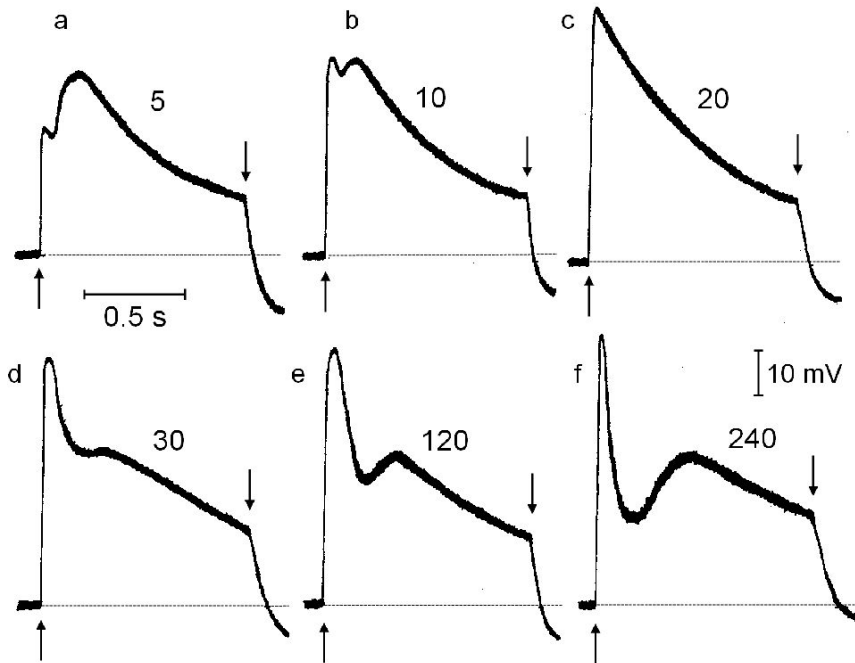
Напряженность эл поля $0.1 \text{ В} / 5 \cdot 10^{-7} \text{ см} = 2 \cdot 10^5 \text{ В/см}$

Начальные стадии ф-за протекают в эл поле; напряженность меняется во времени.

Амплитуда изменений $\Delta\phi$ близка к амплитуде потенциала действия возбудимых м-н.

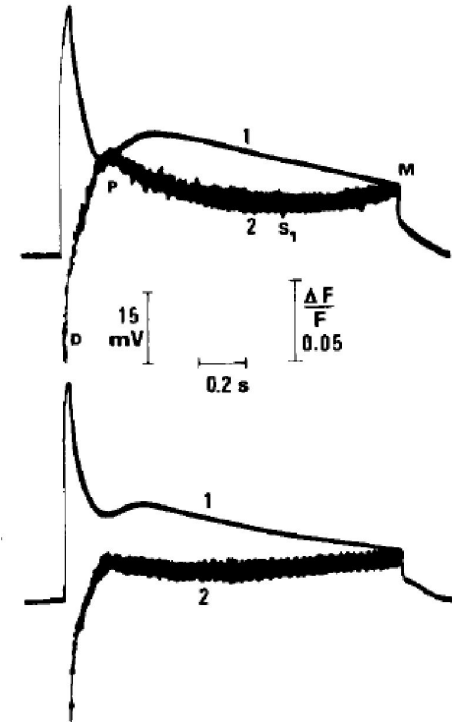
Кинетика потенциала *in vivo* зависит от длительности предшествующего периода темноты

Зависимость фотогенерации $\Delta\phi$ в Хл-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 $\Delta\phi$ и флуоресценции Хл-тов после разных периодов темноты

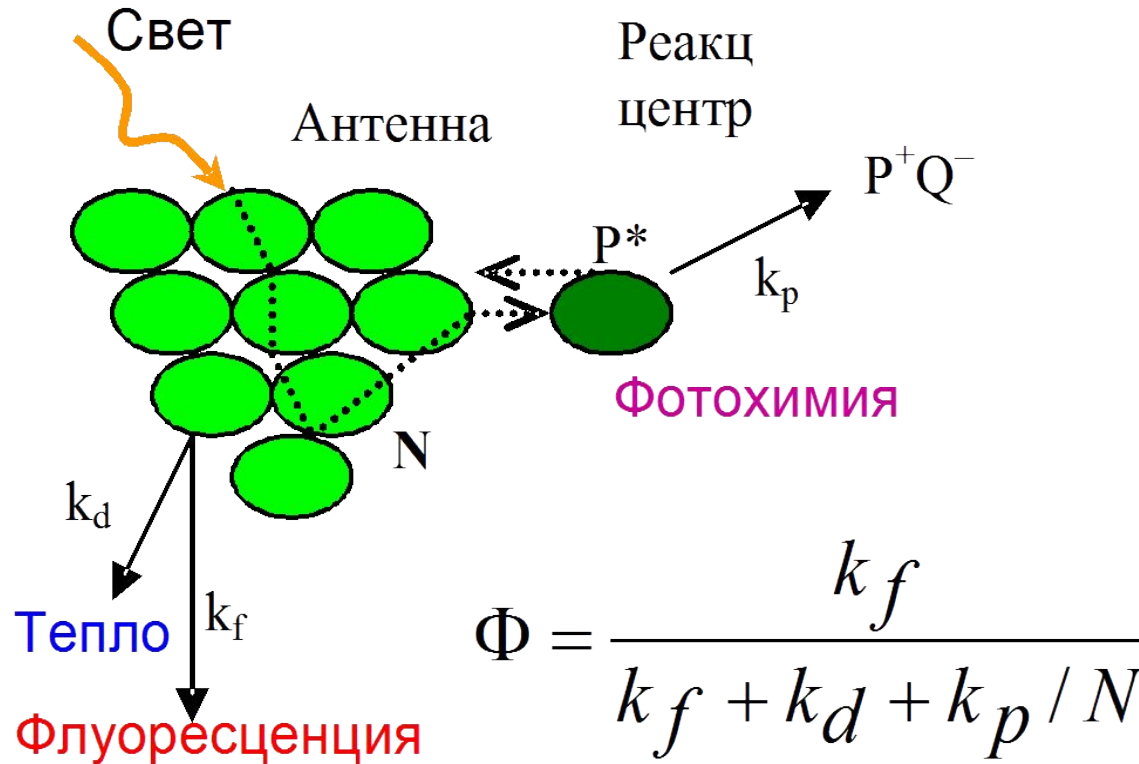


Фотоактивация переноса электронов на акцепторной стороне ФС1 вызывает временное окисление QA (спад фл-ции) синхронное с возрастанием $\Delta\phi$

Влияет ли $\Delta\phi$ на ф-с поток электронов и флуоресценцию Хл?

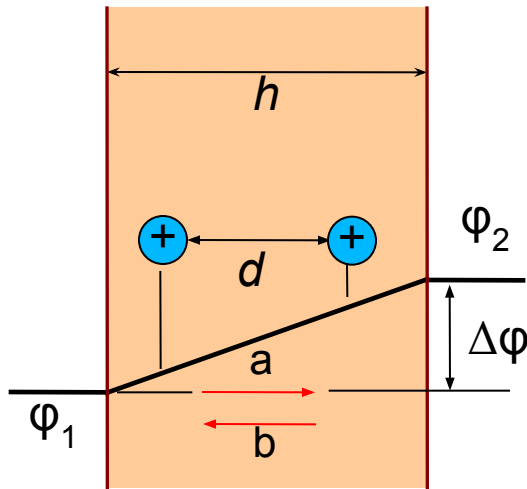
Влияние эл поля на ф-с транспорт электронов.

Пути утилизации и потерь световой энергии в фотосинтетическом аппарате



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



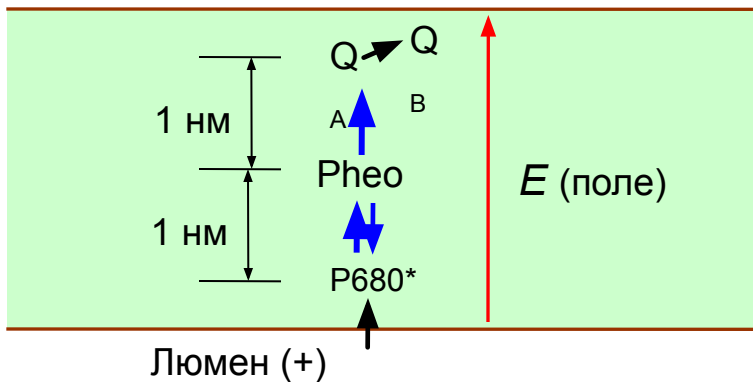
$$\Delta E =$$

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

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

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

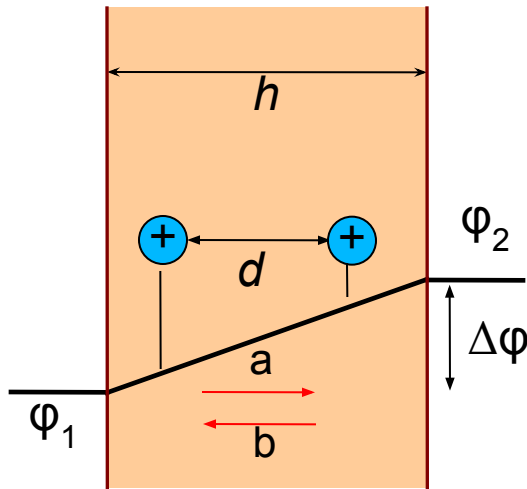
Строма (-)



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

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



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

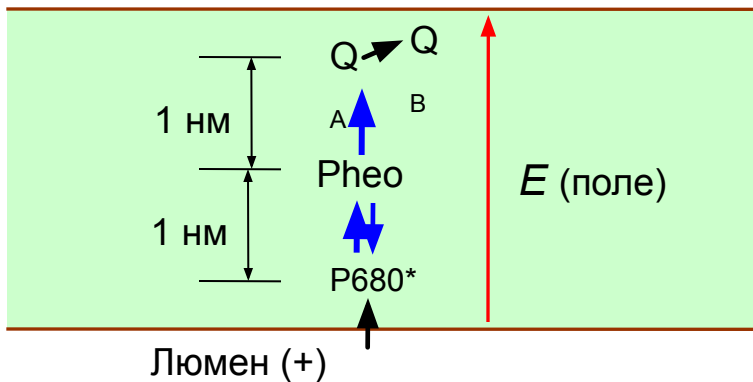
При наличии $\Delta\phi$ энергия иона зависит от его положения в м-не

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

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

a, b – константы скорости прямого и обратного переноса заряда
 b/a – константа равновесия
 $\Delta\phi = \phi_2 - \phi_1$

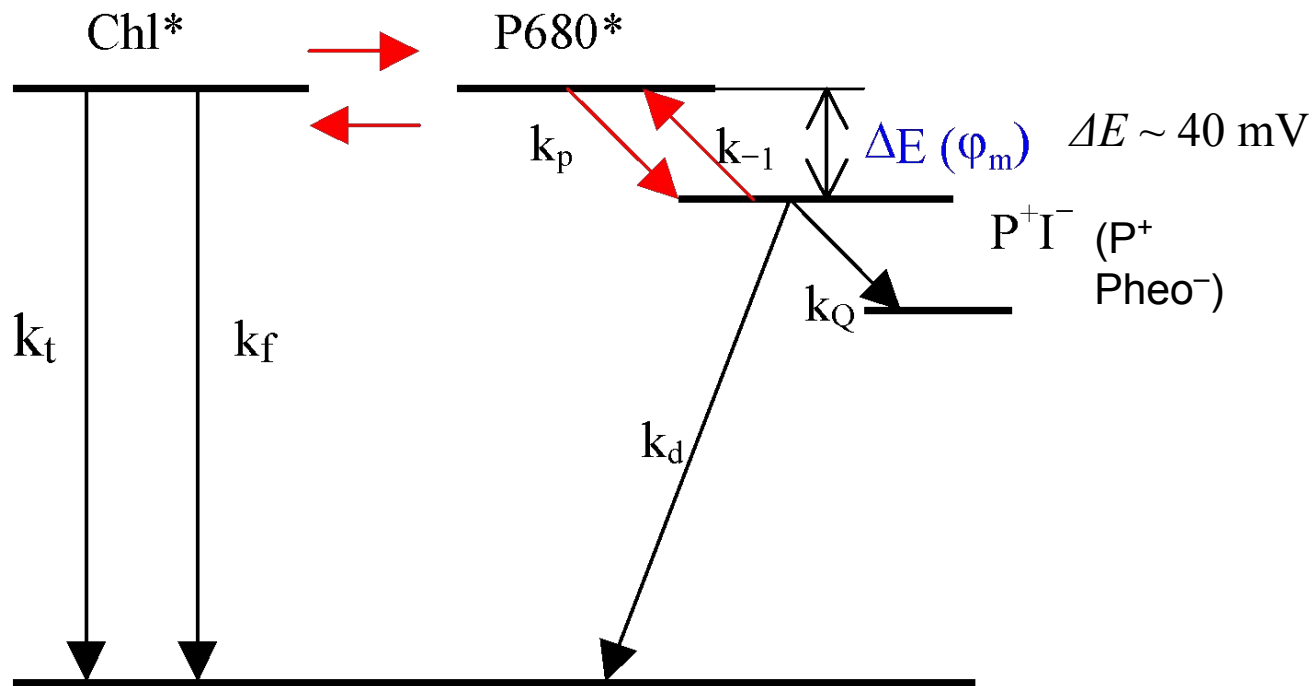
Строма (-)



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

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).

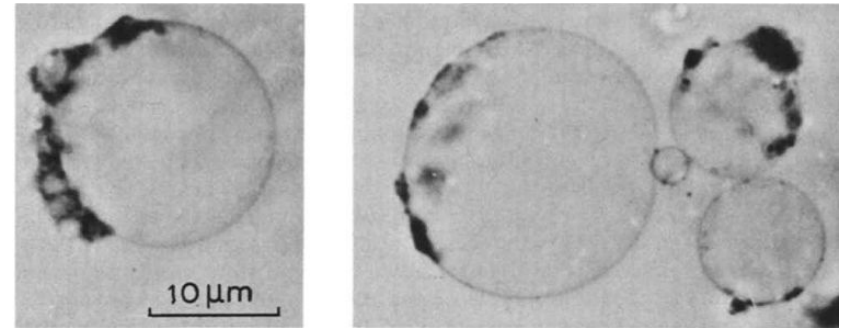
Влияние локального эл поля Q_A на кривые потенц энергии Хл антенны и радикальной пары P^+I^-



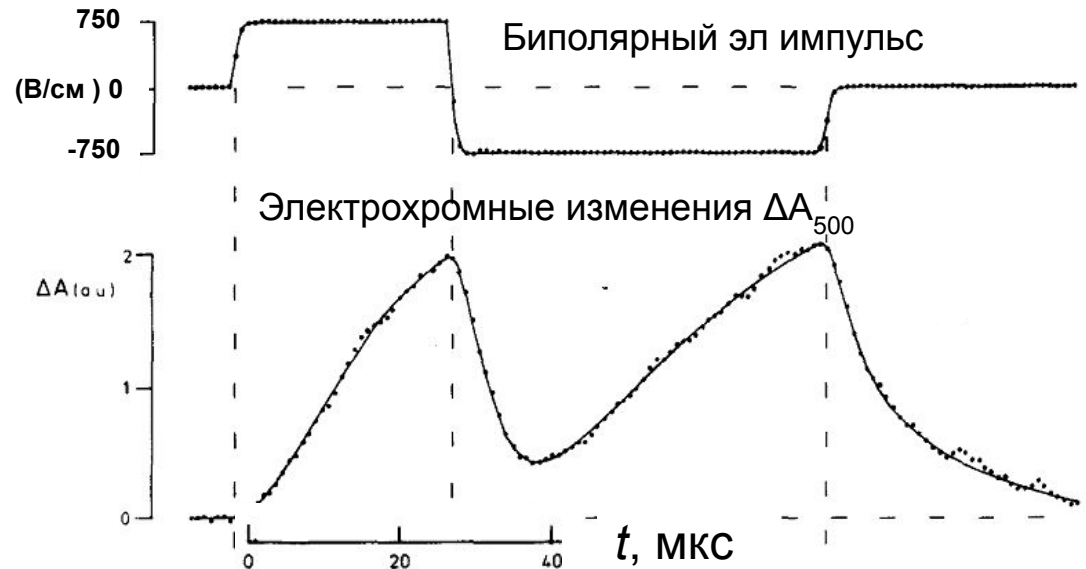
Schatz et al. 1988

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

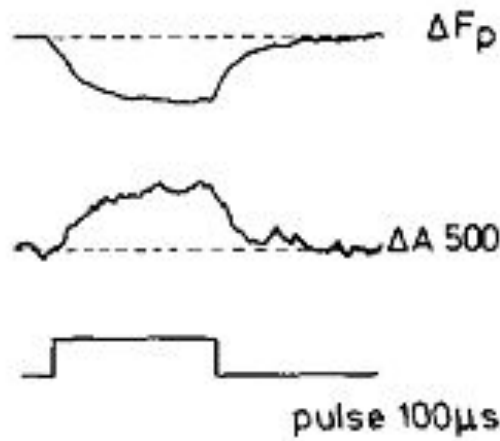


Блебы (De Grooth et al. 1980)

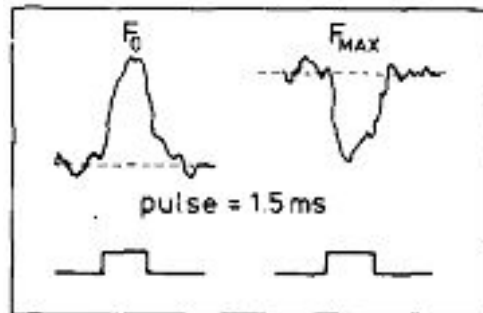


Влияние эл поля на тилакоиды, набухшие в гипотонической среде

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



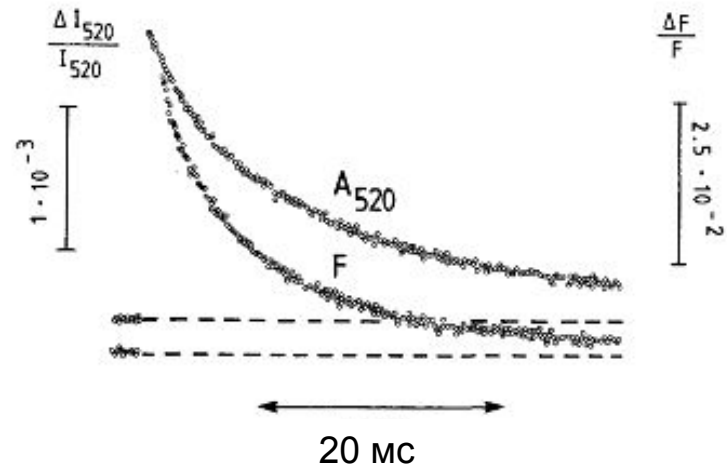
Meiburg et al. 1983



Интерпретация осложнена

Измерения на целых листьях при генерации Δφ фотосистемой

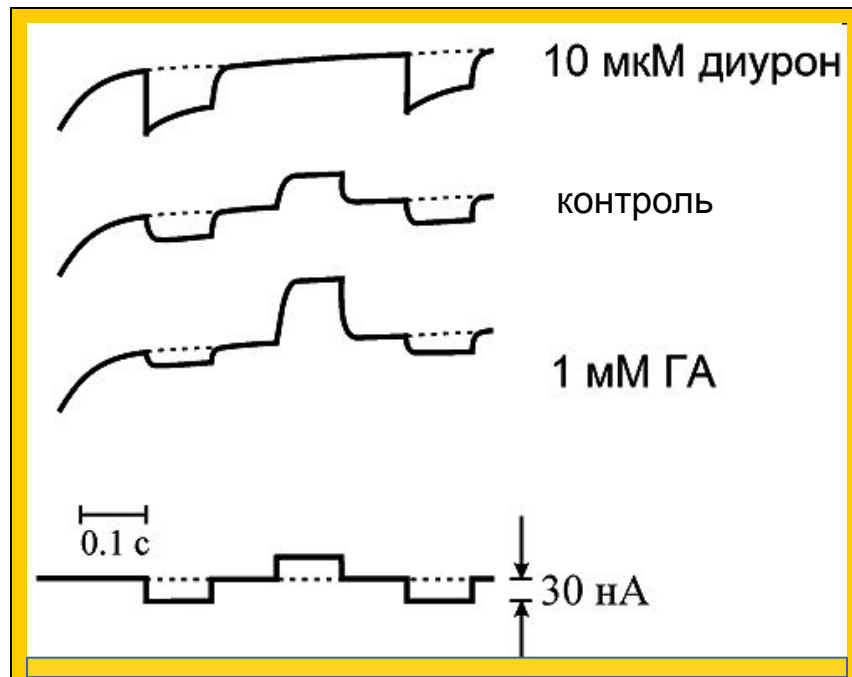
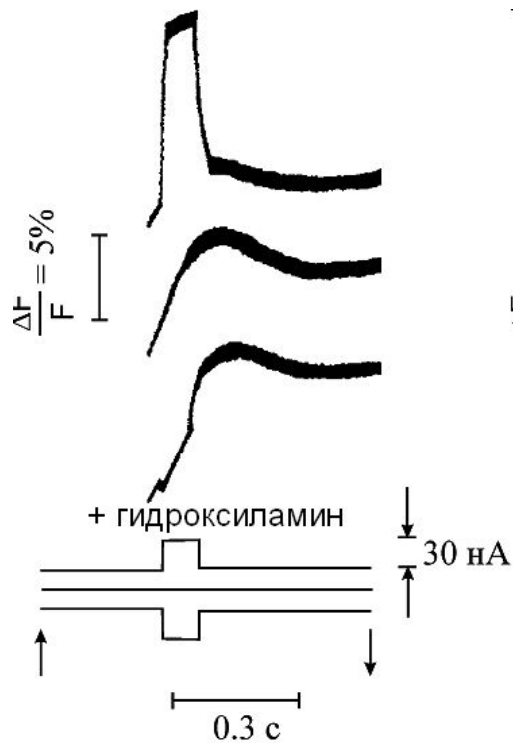
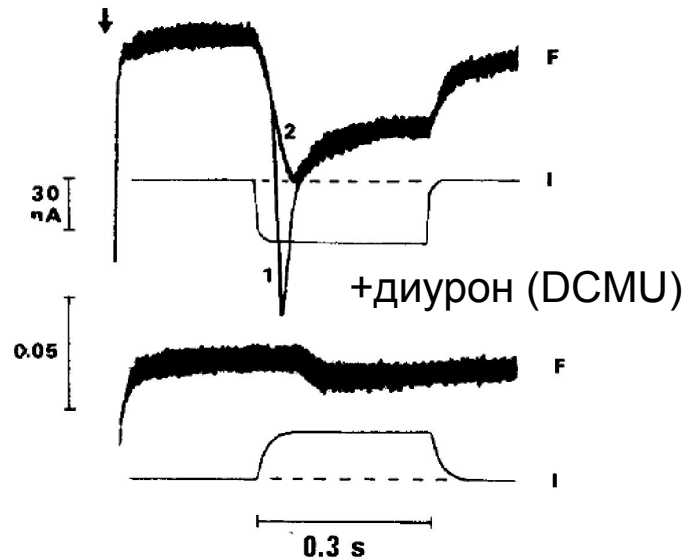
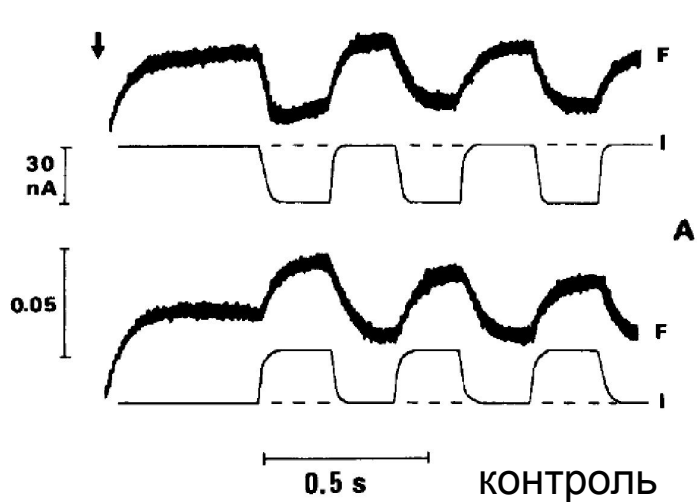
1



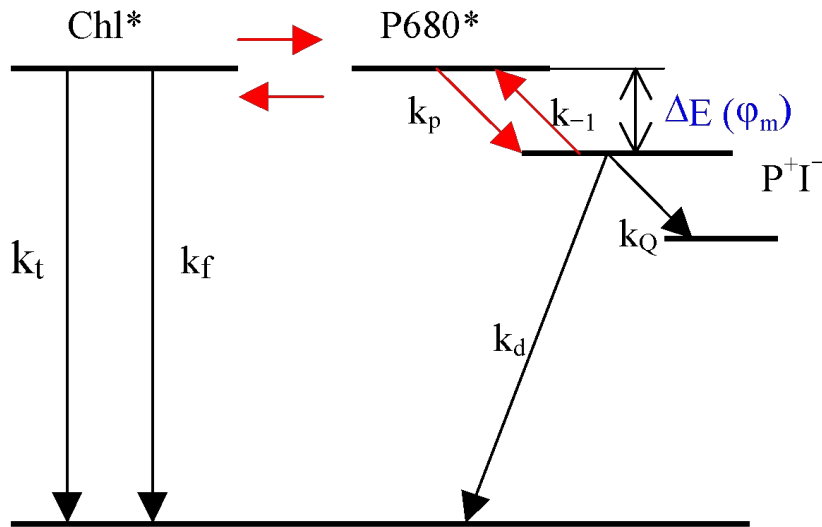
Dau et al. 1991

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

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



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



Влияние $\Delta\varphi$ 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⁺ Pheo⁻ и P680* быстро уравниваются. 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

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

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

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

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

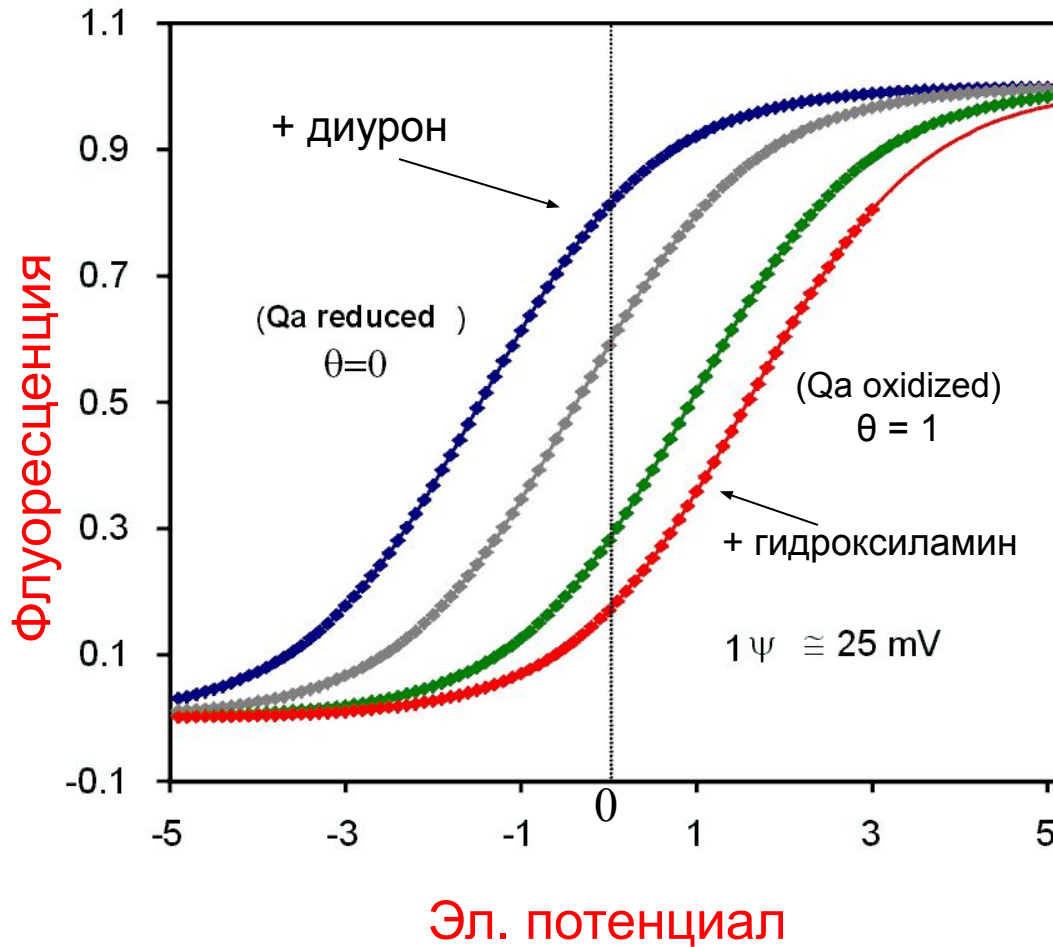
θ – доля окисл. формы акцептора Q_A

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

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)



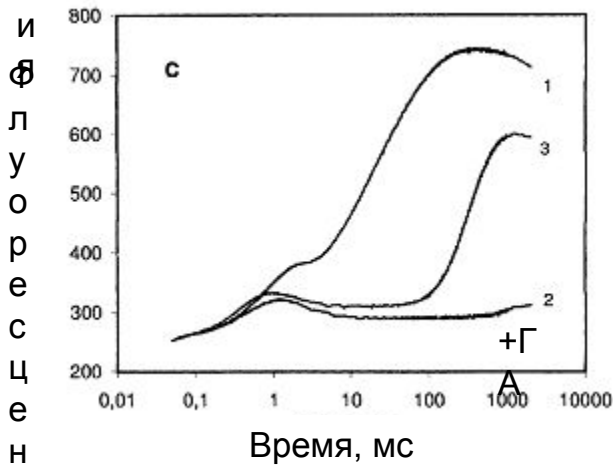
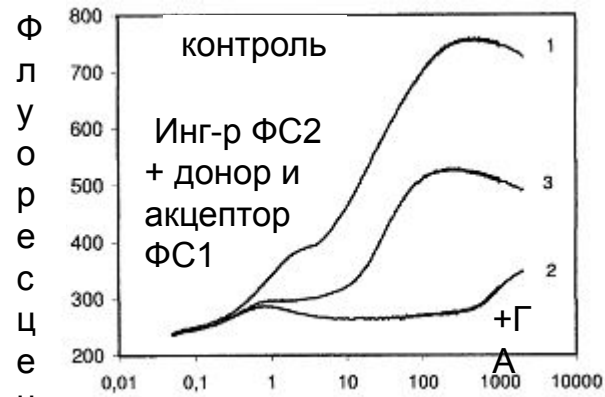
В опытах с генерацией диф. потенциала при солевом «ударе» фл-ция сдвигается на ~10% при сдвиге $\Delta\psi$ на 100 мВ.

Модель объясняет, почему биполярные импульсы тока вызывают асимметричные или симметричные сдвиги флуоресценции при разном состоянии QA, т.е.

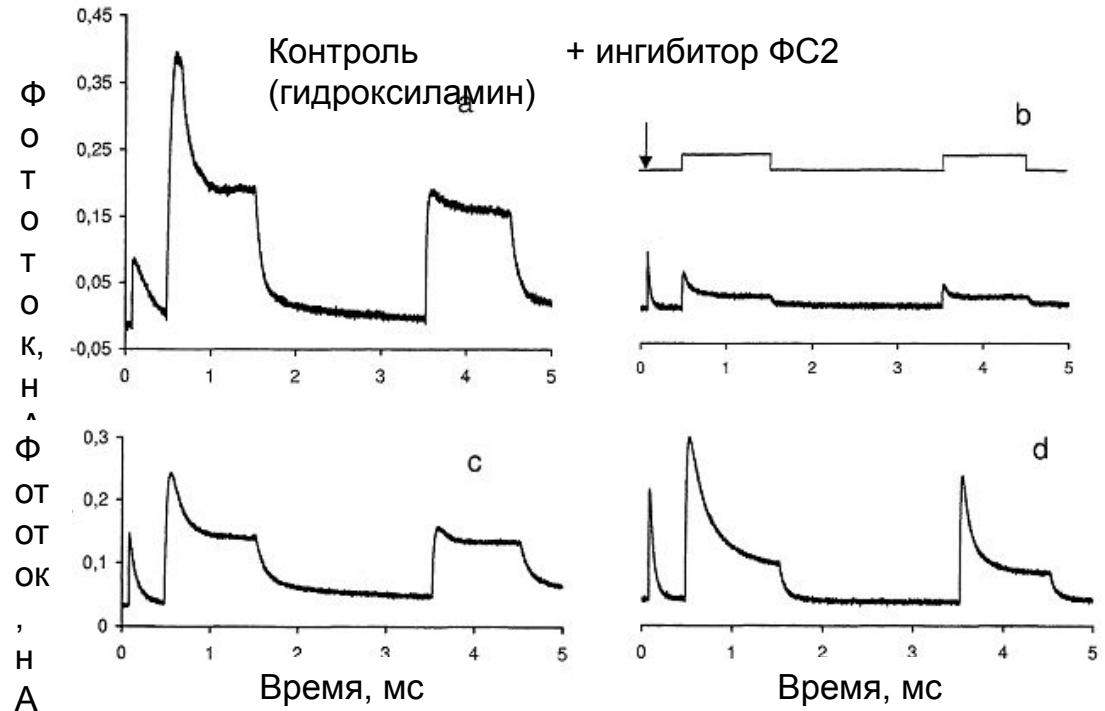
- в норме (на свету),
- в присутствии диурона,
- в среде с гидроксилламином

Зависимость флуоресценции хлорофилла от электрогенных процессов в ФС1

Флуоресценция изолир. Хп



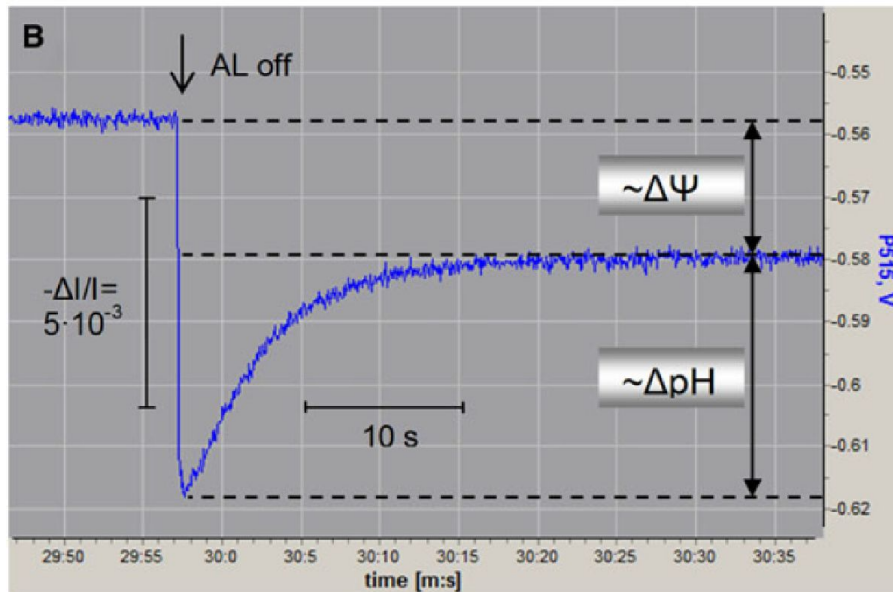
Фототок в изолированных хлоропластах



Гидроксиламин + донор и акцептор для
ФС1

(ТМФД / метилвиологен; восст. ДХФИФ /
МВ)

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

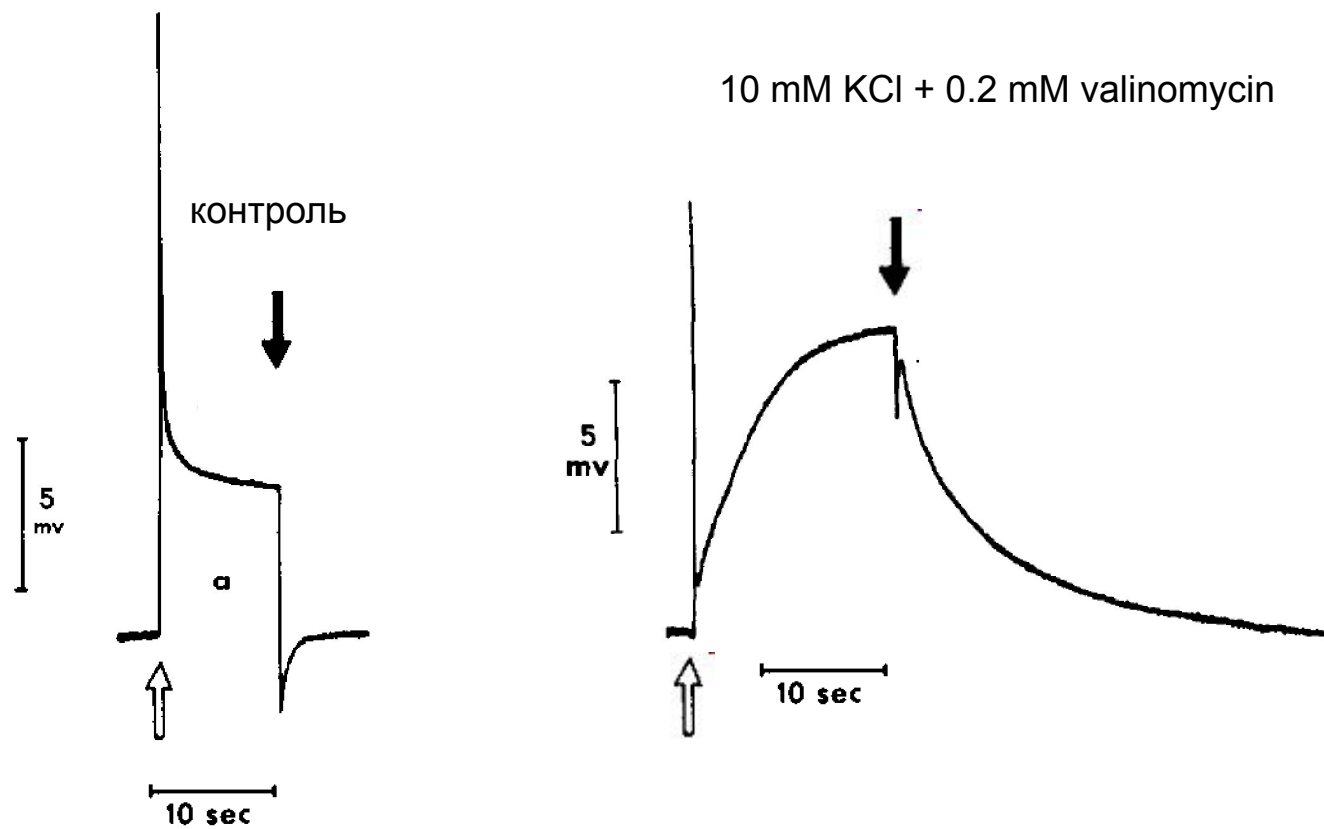


Изменения поглощения в области 515 нм (электрохромные изменения) служат показателем $\Delta\psi$. Реакция $\Delta\psi$ на выключение света позволяет разделить эти компоненты.

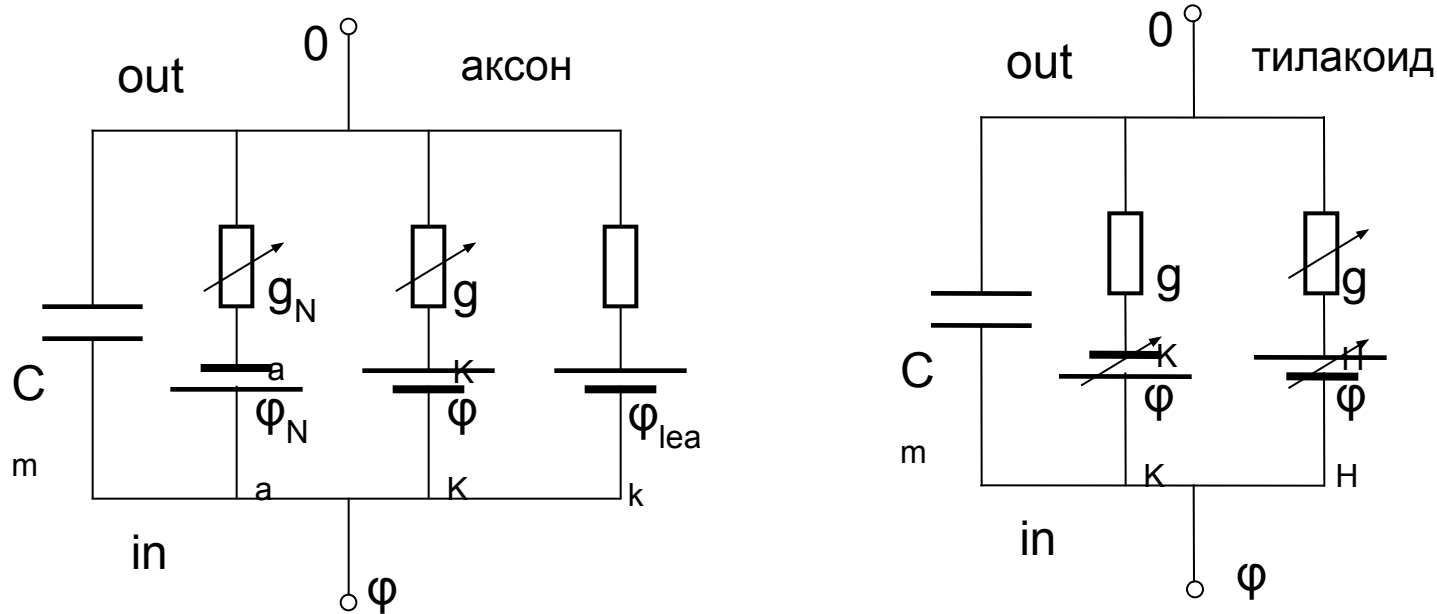
В данном примере на долю $\Delta\psi$ приходится $\sim 40\%$.

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



Отличие в эквивалентных схемах для аксона и тилакоидной м-ны

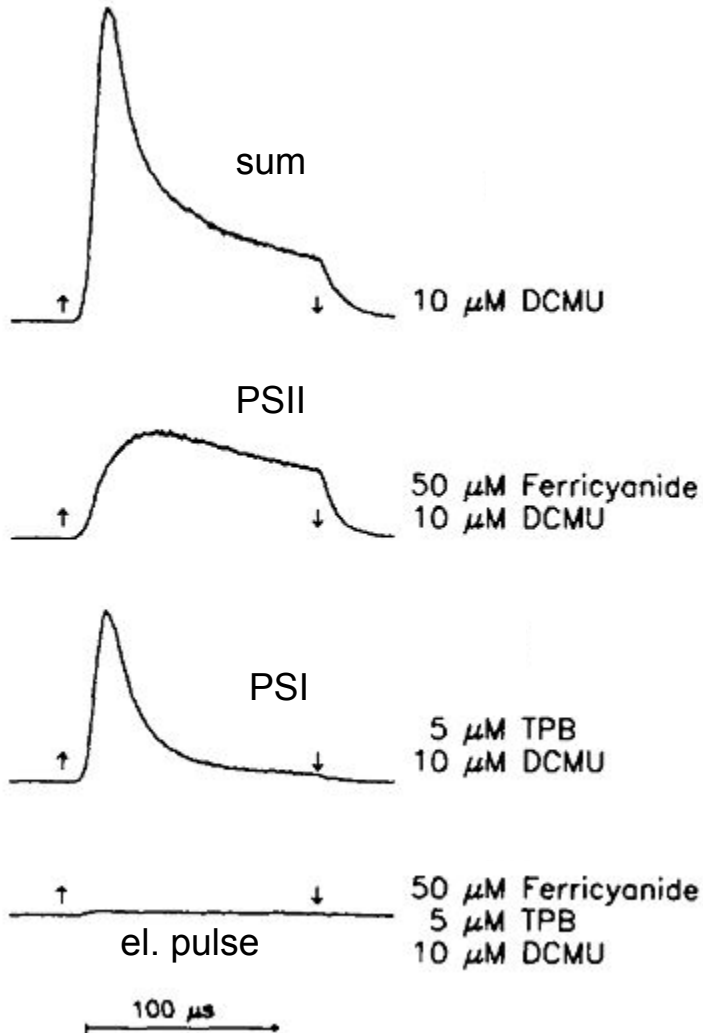


За время ПД ~ 1 мс конц-ии ионов внутри и снаружи не изменяются, значения эдс φ_{Na} и φ_K – константы, так как уровни K^+ и Na^+ высоки: $[K^+]_i \sim 100$ мМ и $[Na^+]_i \sim 10$ мМ.

Конц-ия H^+ на свету в люмене возрастает в сотни раз, а в строме снижается. Это меняет значения эдс φ_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 φ_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-