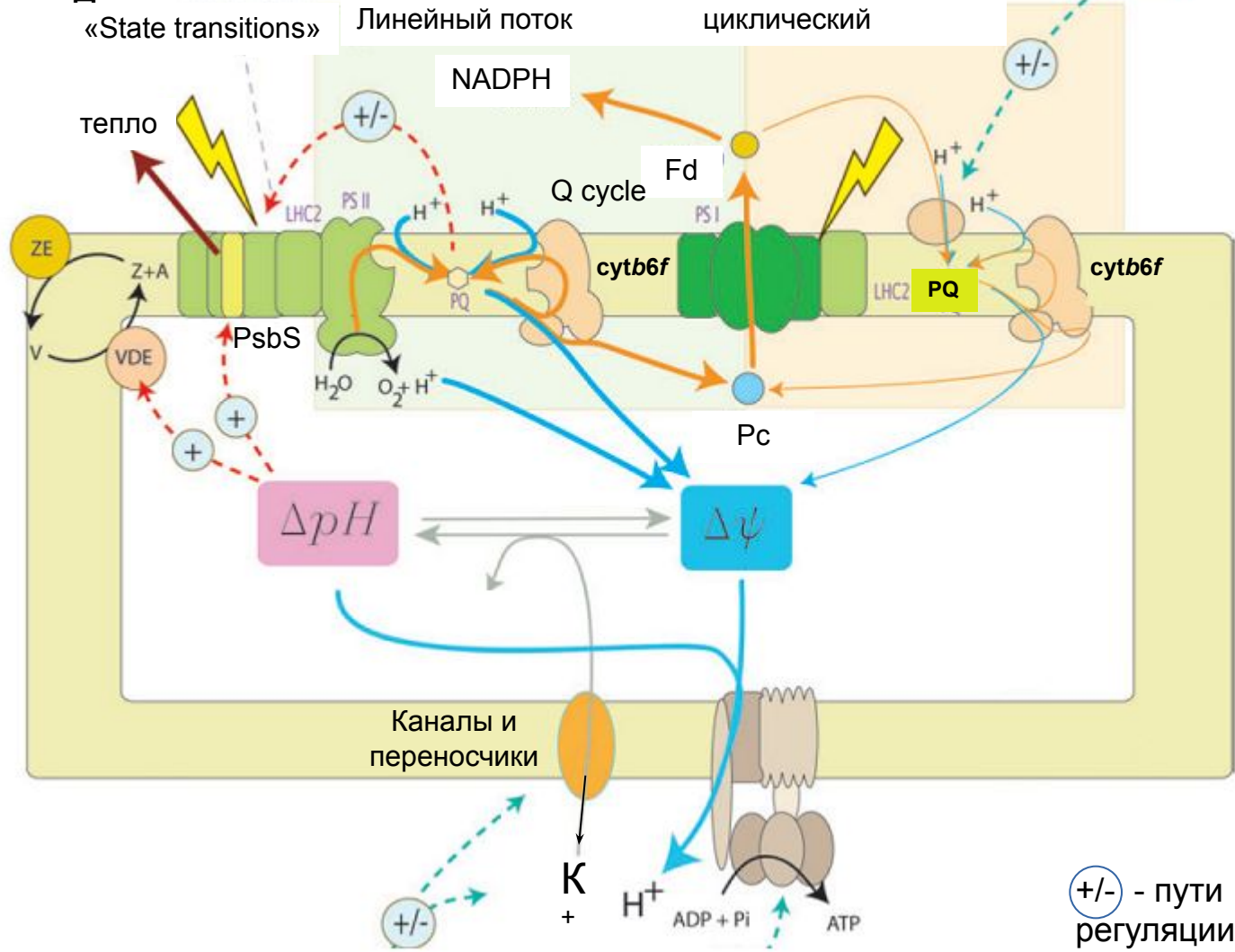


# Эл. поля в фотосинтетических мембранах

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

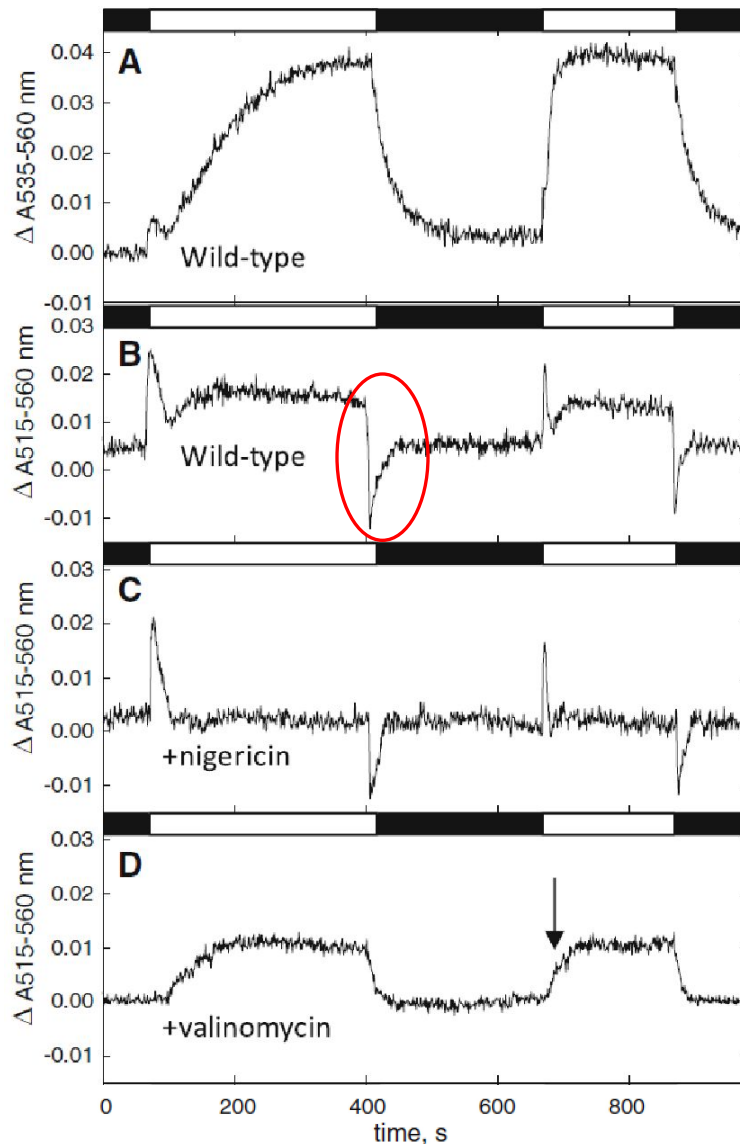
(Avenson...Kramer, 2005)

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  $\Delta A_{515-560}$

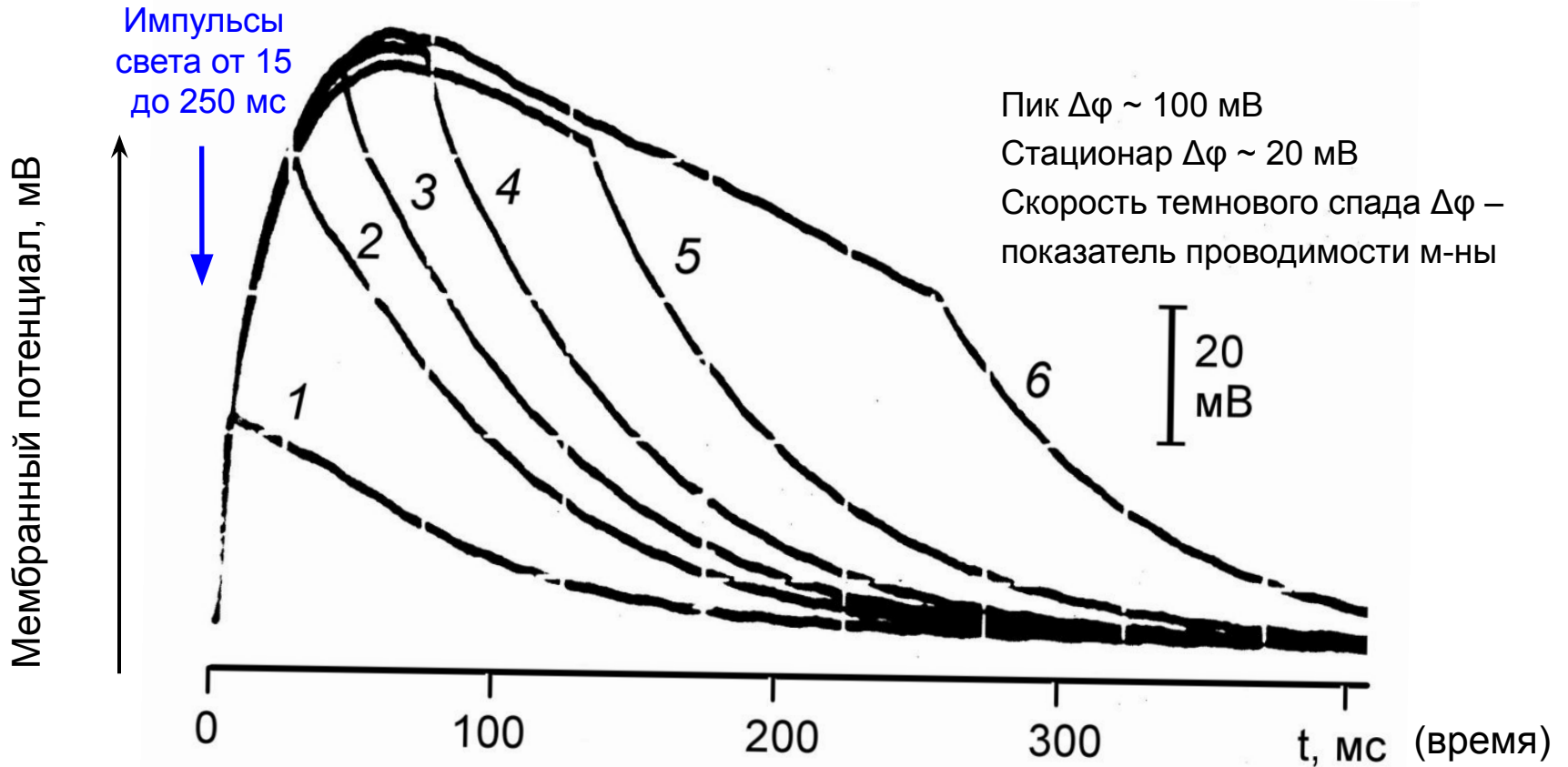
Контроль без ионофоров

+нигерин (K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> обмен)

+ валиномицин (повышает K<sup>+</sup>-проводимость, снимает  $\Delta\phi$ )

# Фотогенерация мембранного потенциала в тилакоидах

Микроэлектродная регистрация  $\Delta\phi$



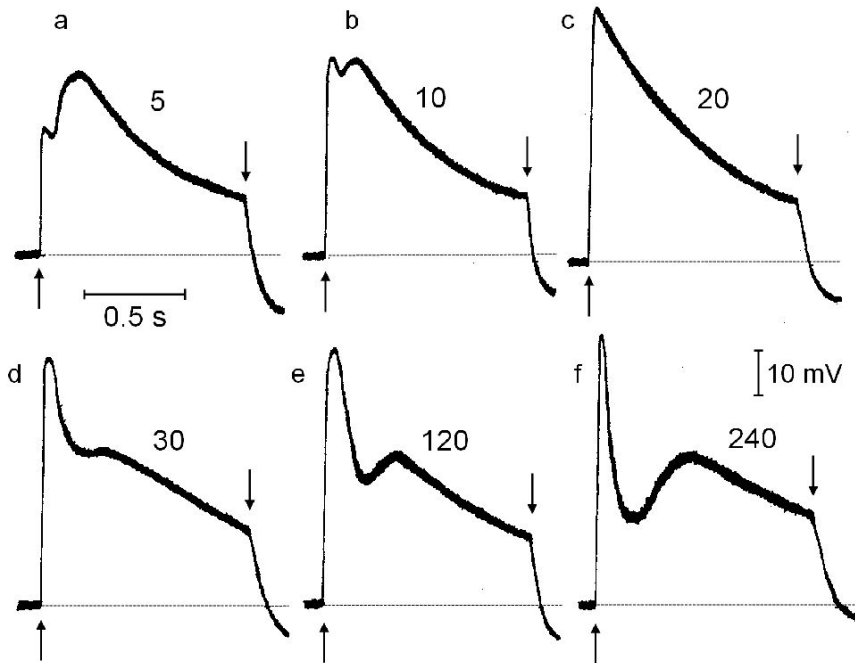
Напряженность эл поля  $0.1 \text{ В} / 5 \cdot 10^{-7} \text{ см} = 2 \cdot 10^5 \text{ В/см}$

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

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

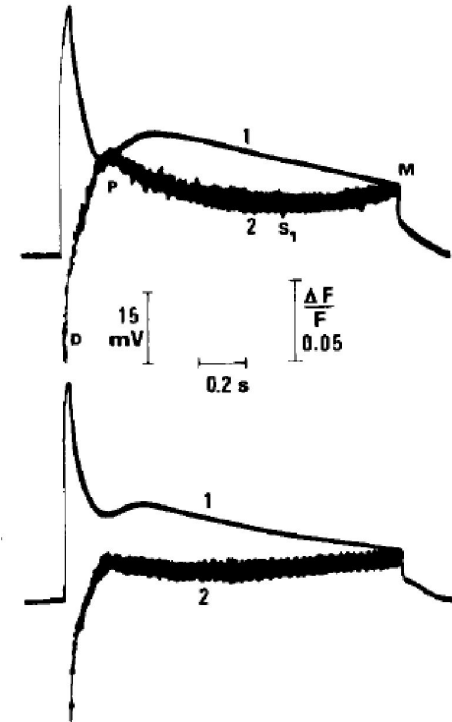
Кинетика потенциала *in vivo* зависит от длительности предшествующего периода темноты

**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**

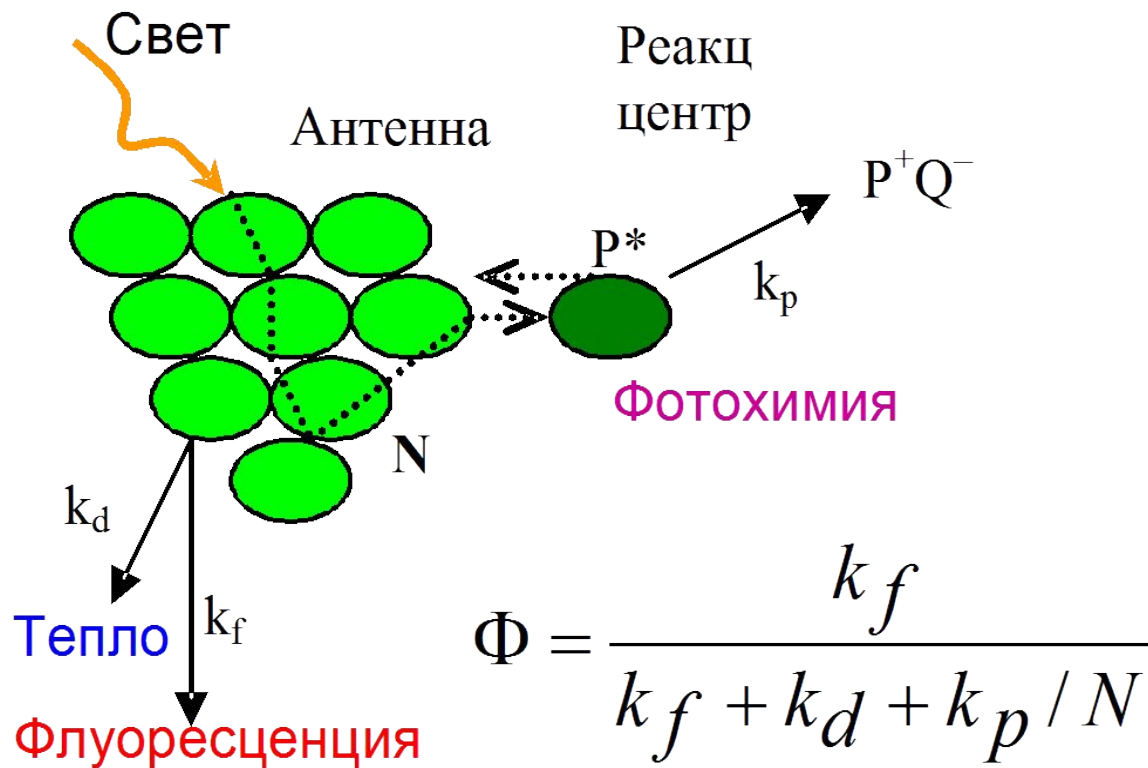


Фотоактивация переноса электронов на акцепторной стороне ФС1 вызывает временное окисление QA (спад фл-ции) синхронное с возрастанием  $\Delta\phi$

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

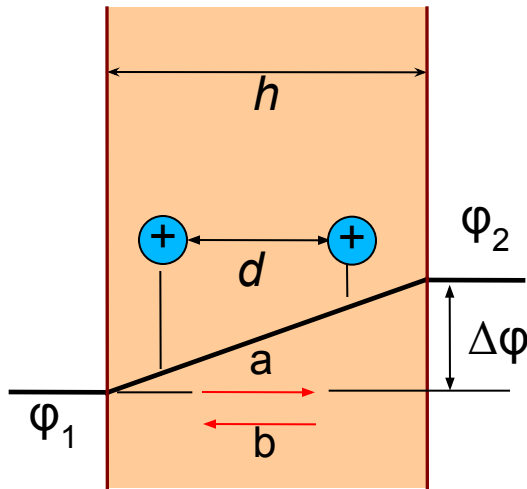
## Влияние эл поля на ф-с транспорт электронов.

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



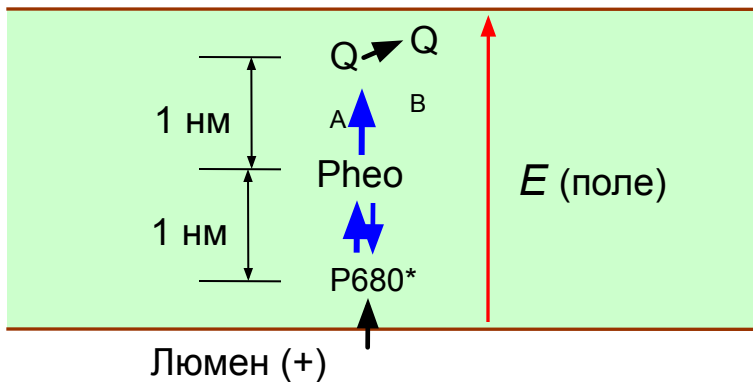
$$\Delta E =$$

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

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

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

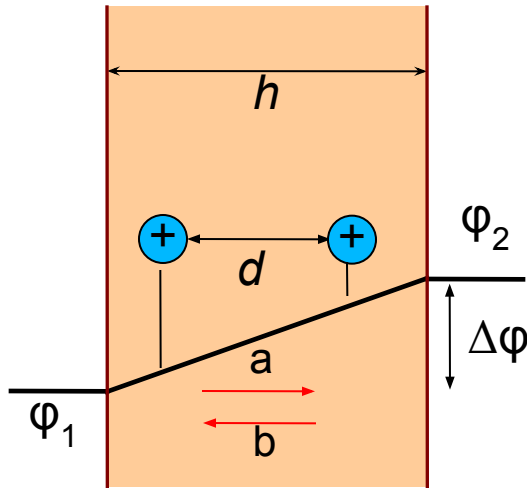
Строма (-)



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



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

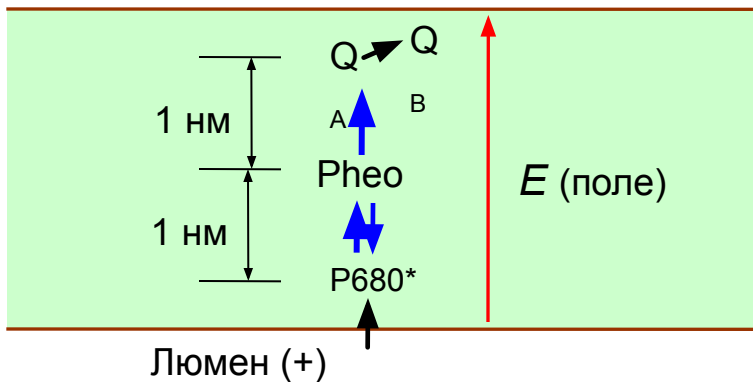
При наличии  $\Delta\phi$  энергия иона зависит от его положения в м-не

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

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

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

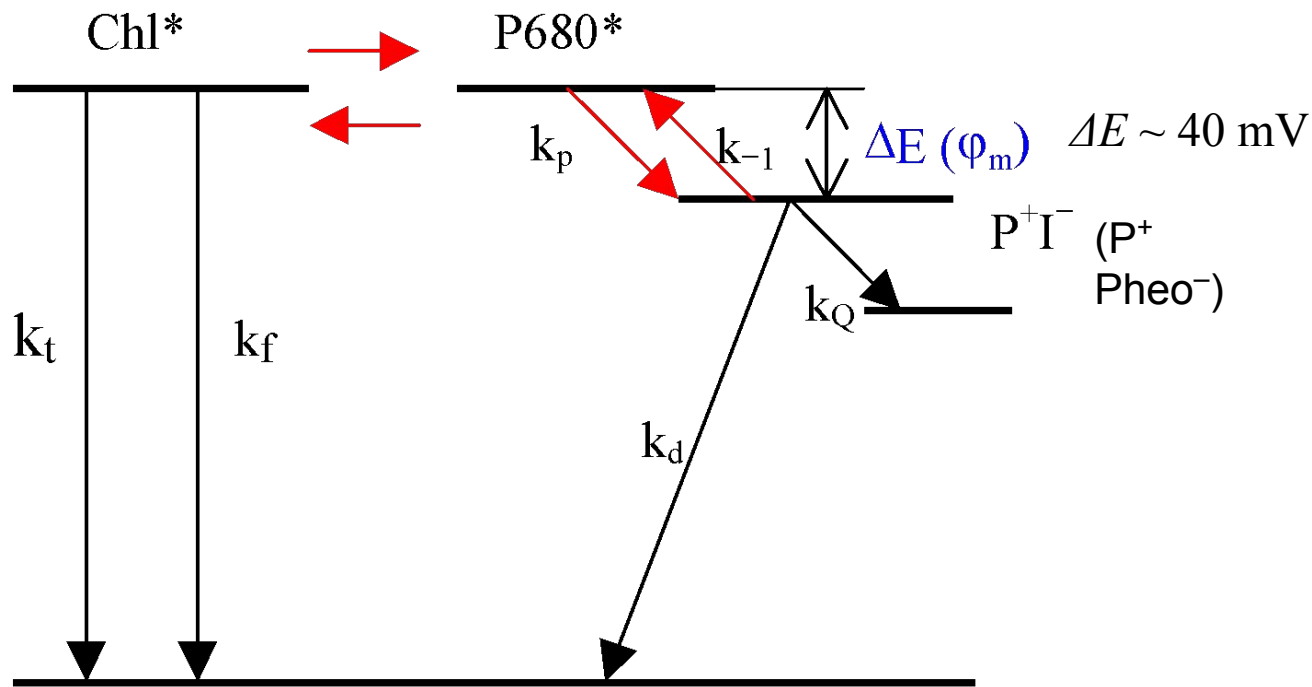
Строма (-)



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**

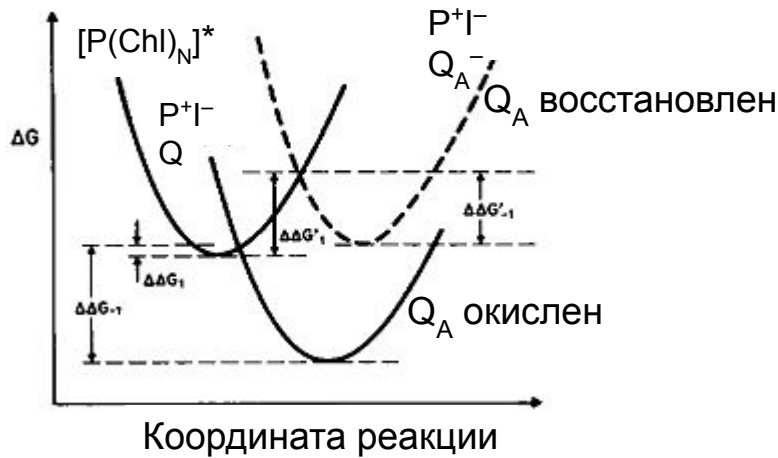


$k_t$  – диссипация в тепло (thermal)  
 $k_f$  – флуоресценция  
 $k_d$  – рекомбинация зарядов без излучения  
 $k_Q$  – перенос электрона на акцептор QA

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



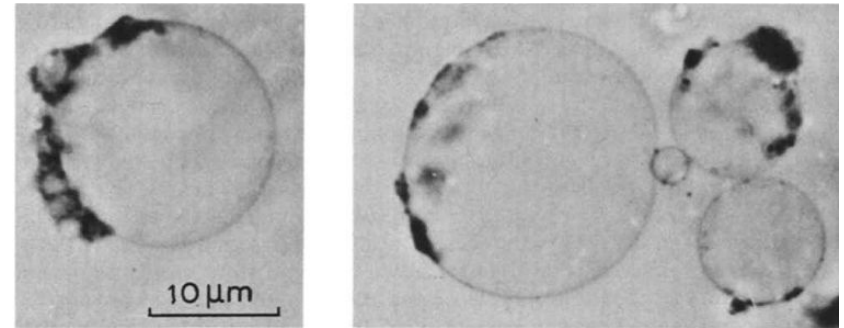
## Влияние локального эл поля $Q_A$ на кривые потенц энергии Хл антенны и радикальной пары $P^+I^-$



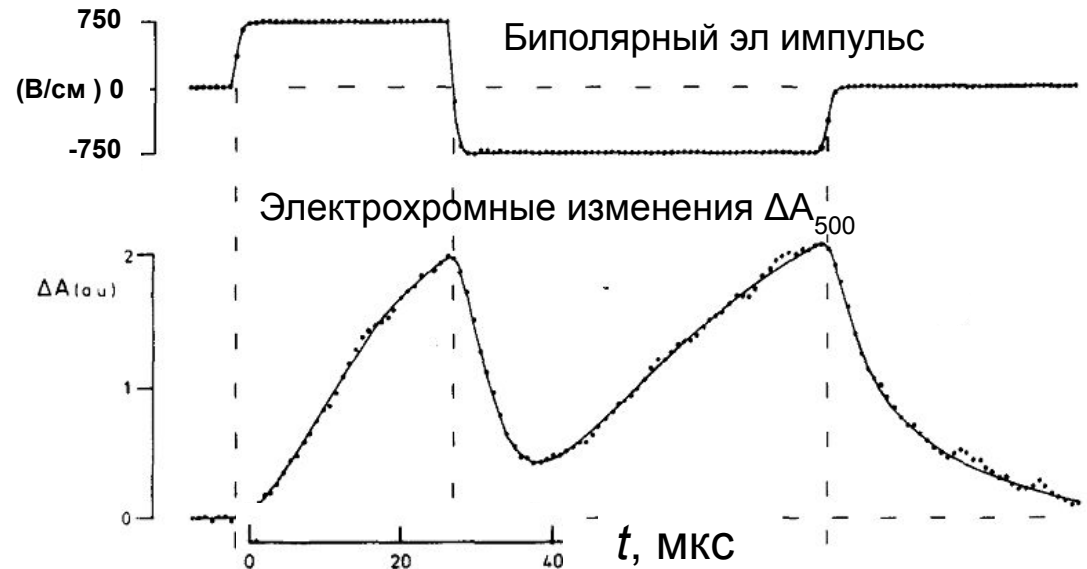
Schatz et al. 1988

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

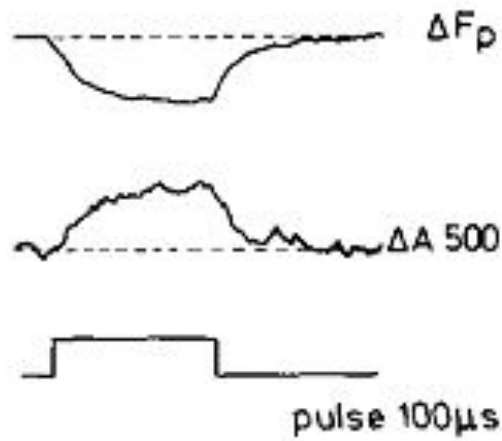


Блебы (De Grooth et al. 1980)

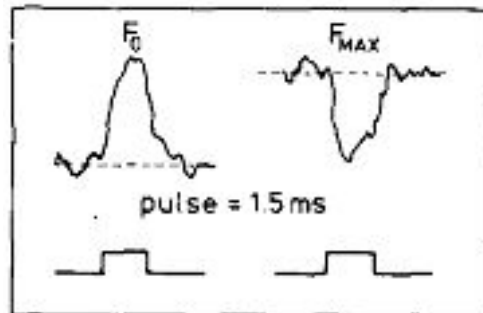


## Влияние эл поля на тилакоиды, набухшие в гипотонической среде

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



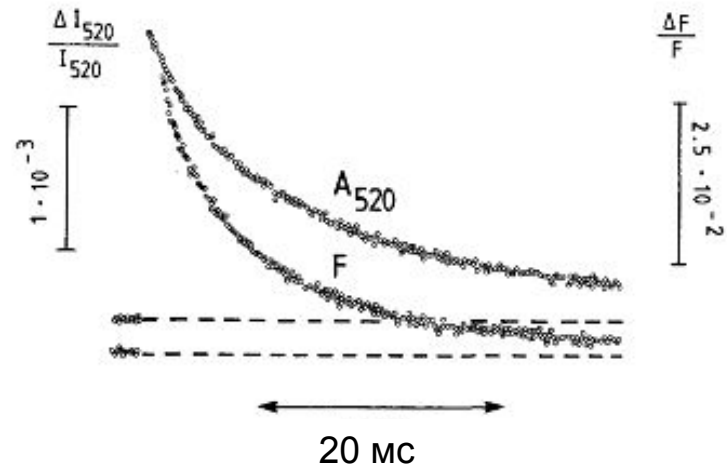
Meiburg et al. 1983



Интерпретация осложнена

## Измерения на целых листьях при генерации $\Delta F$ фотосистемой

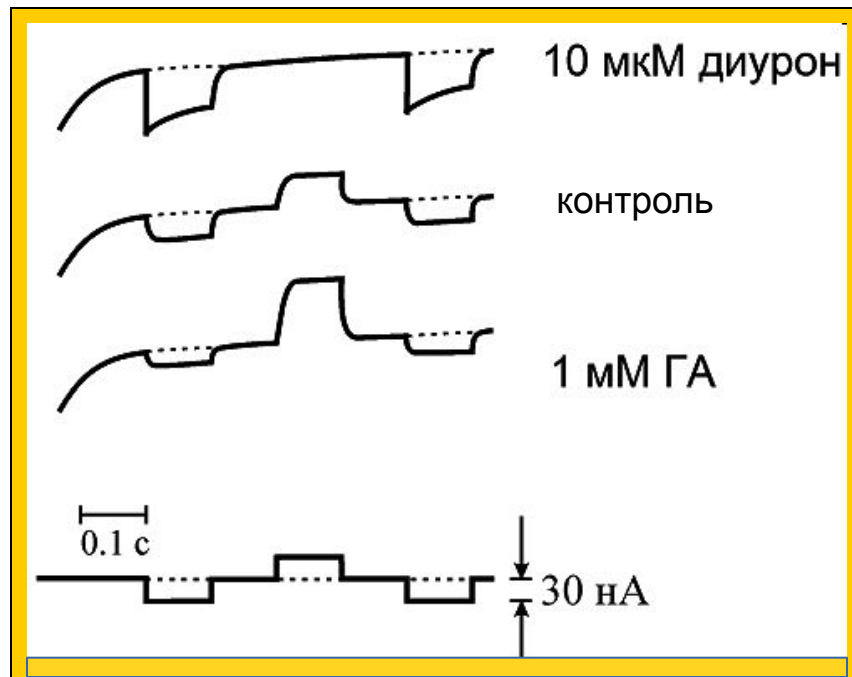
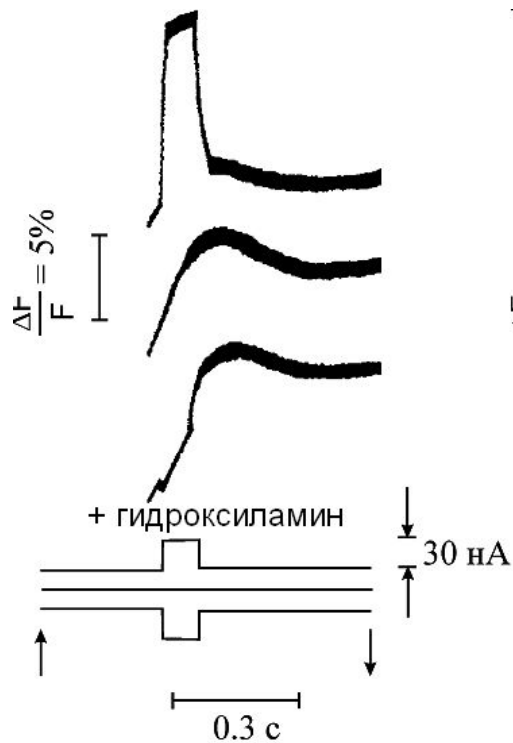
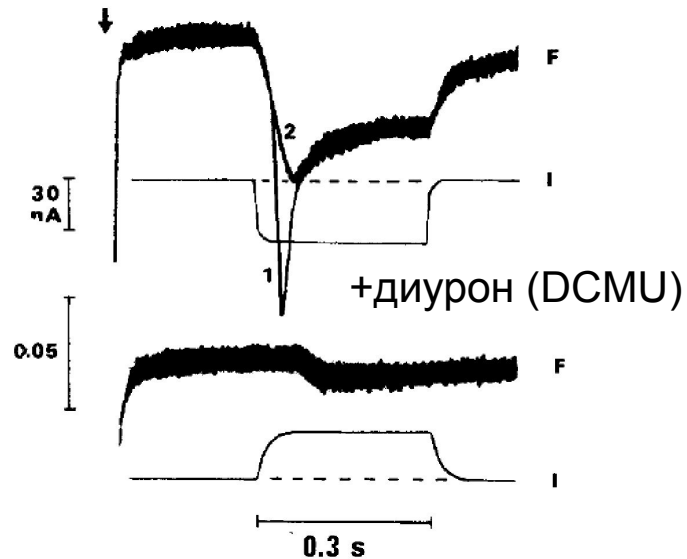
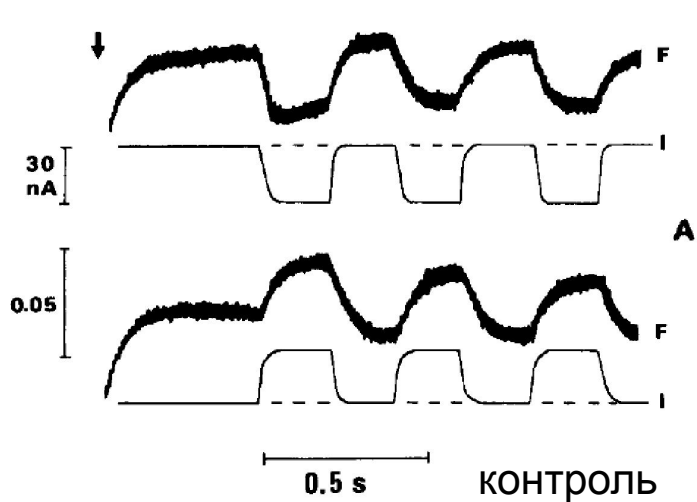
1



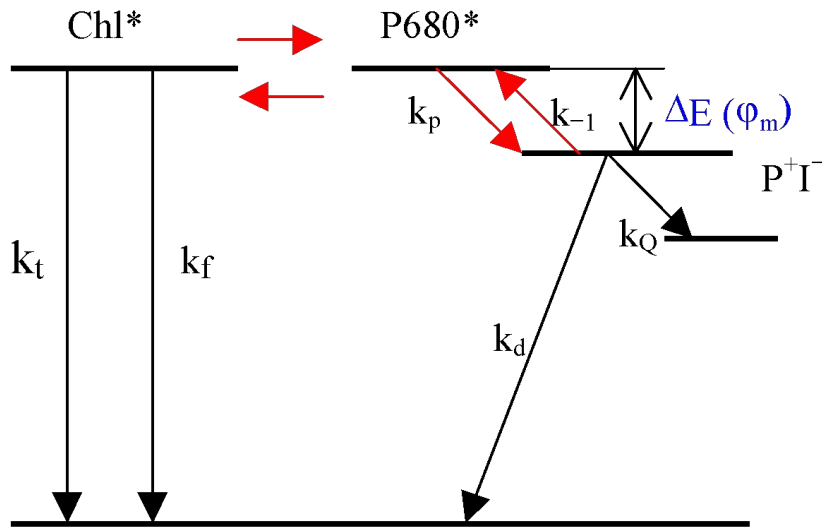
Dau et al. 1991

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<sup>+</sup> Pheo<sup>-</sup> и P680\* быстро уравниваются. Вероятности состояний P680<sup>+</sup> Pheo<sup>-</sup> и P680\* обозначим  $x$  и  $y$ .

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

## Зависимость фл-ции хлорофилла от потенциала $\phi$ на м-не тилакоида

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

Влияние потенциала  $\phi$  на относительную заселенность (вероятность) состояний P680\* и P+Pheo- ( $\phi_o$  – 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 ( $\theta$ )

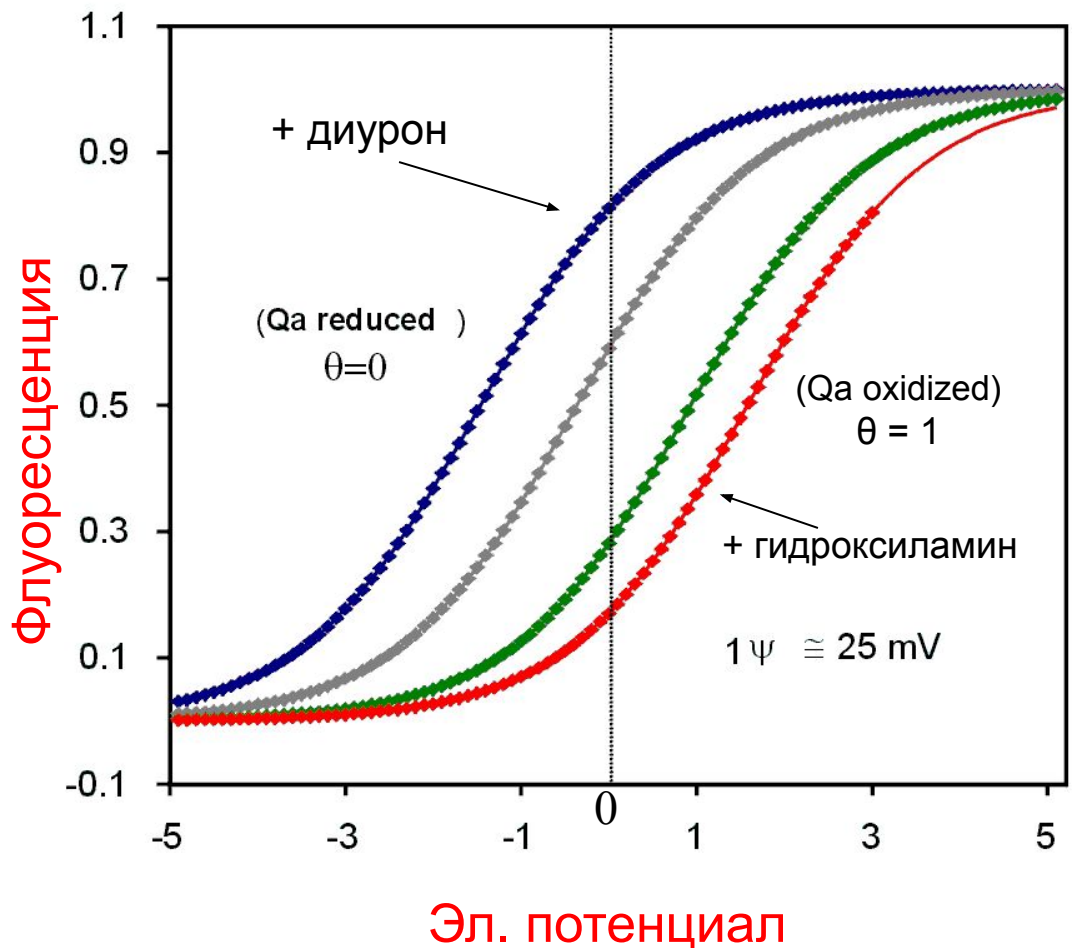
$\theta$  – доля окисл. формы акцептора  $Q_A$

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

Зависимость выхода фл-ции от разности потенциалов  $\phi$  на участке мембраны между P680\* и P+Pheo- .

Величина  $\theta$  – параметр: 0, 0.1, 0.5, 1.0

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



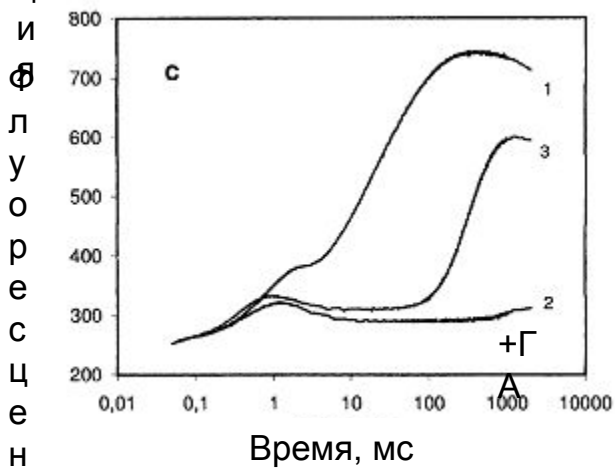
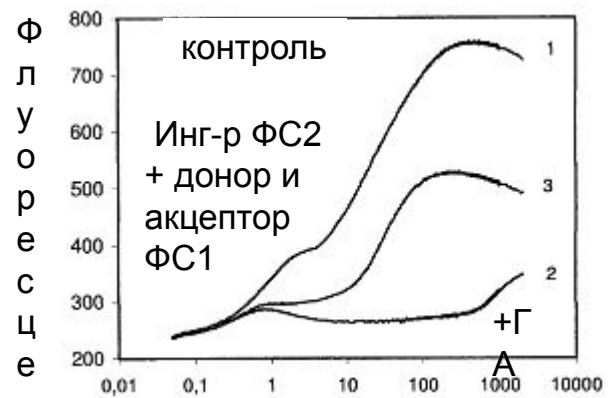
В опытах с генерацией диф. потенциала при солевом «ударе» фл-ция сдвигается на ~10% при сдвиге  $\Delta\psi$  на 100 мВ.

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

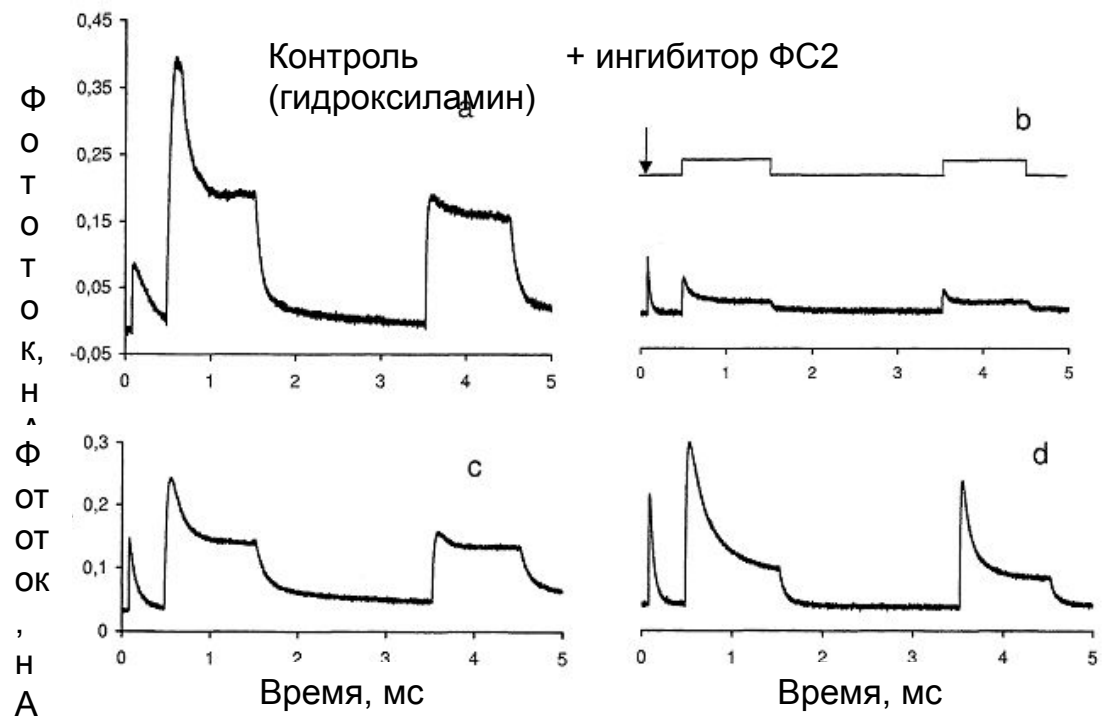
- в норме (на свету),
- в присутствии диурона,
- в среде с гидроксилламином

# Зависимость флуоресценции хлорофилла от электрогенных процессов в ФС1

## Флуоресценция изолир. Хп



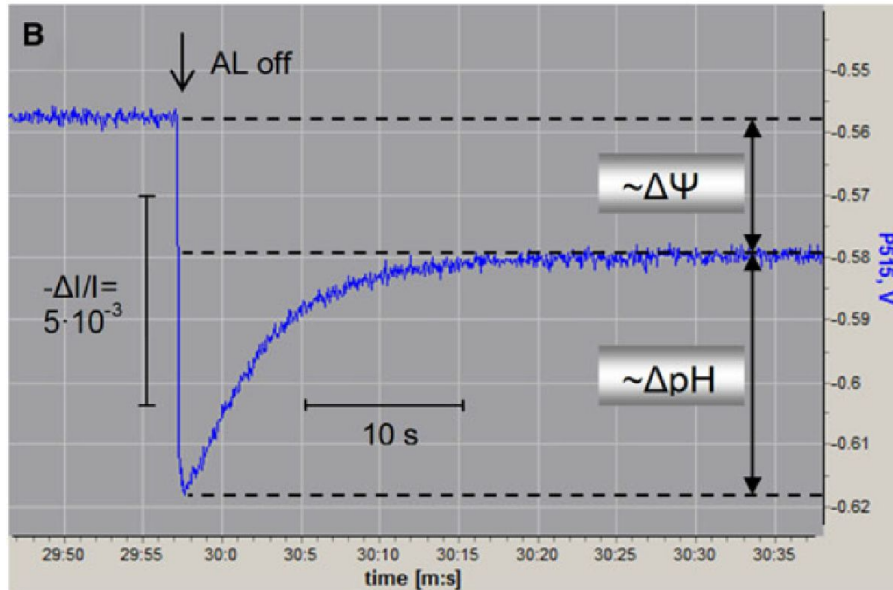
## Фототок в изолированных хлоропластах



Гидроксиламин + донор и акцептор для  
ФС1

(ТМФД / метилвиологен; восст. ДХФИФ /  
МВ)

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



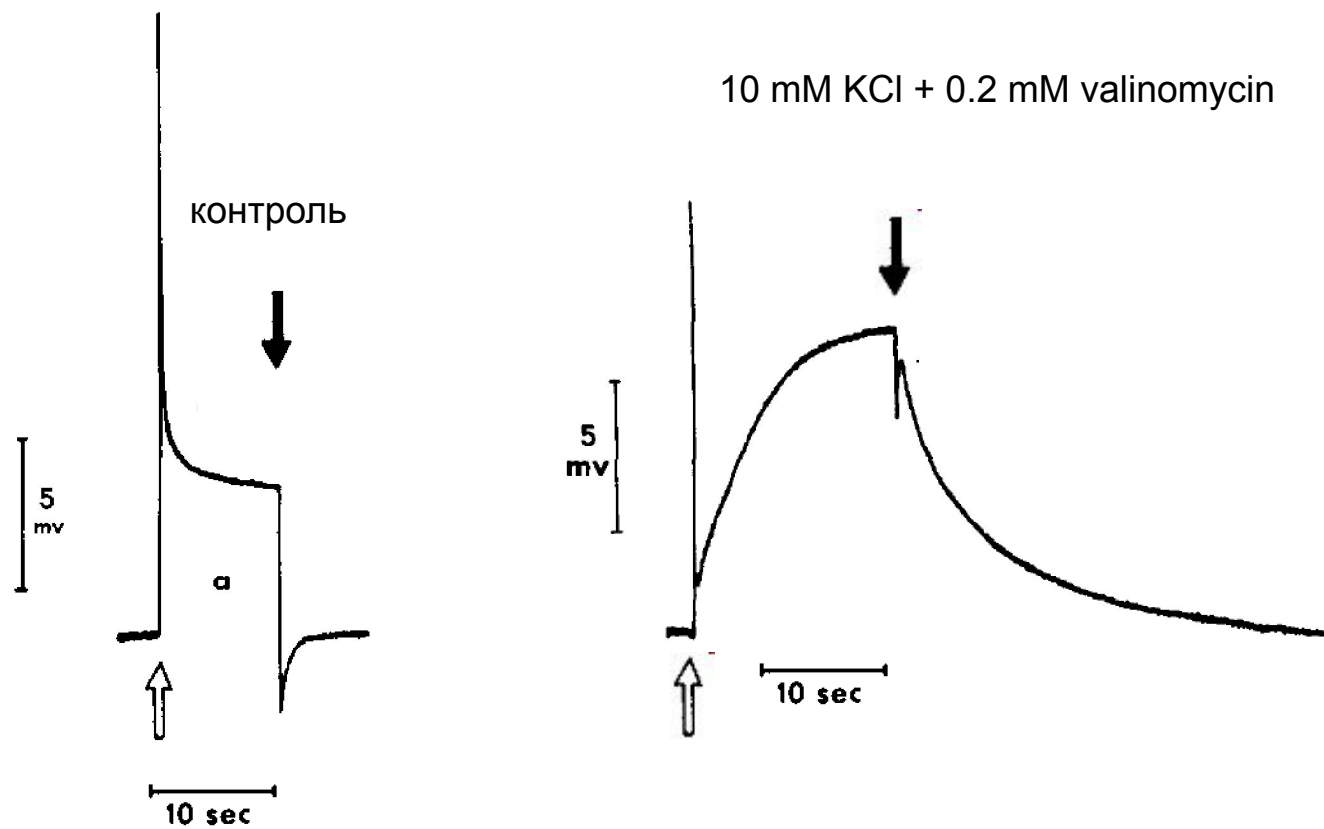
Изменения поглощения в области 515 нм (электрохромные изменения) служат показателем  $\Delta\psi$ . Реакция  $\Delta\psi$  на выключение света позволяет разделить эти компоненты.

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

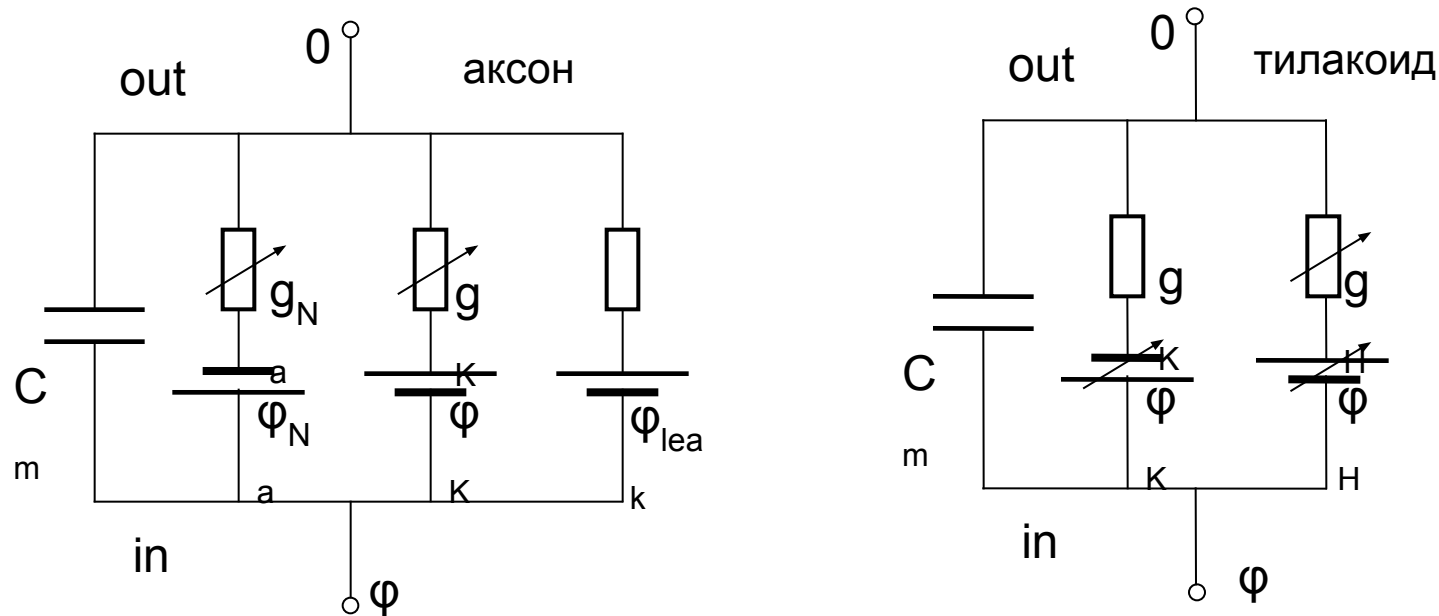
Есть ограничения. Такой анализ применим при условии постоянства и преобладания  $H^+$ -проводимости мембраны. Если  $H^+$ -проводимость подавлена ингибитором (DCCD), отрицательный сдвиг потенциала не возникнет (низкая  $H^+$ -проводимость, малое  $P_H$ ).



Постсветовые потенциалы могут отличаться по знаку



## Отличие в эквивалентных схемах для аксона и тилакоидной м-ны

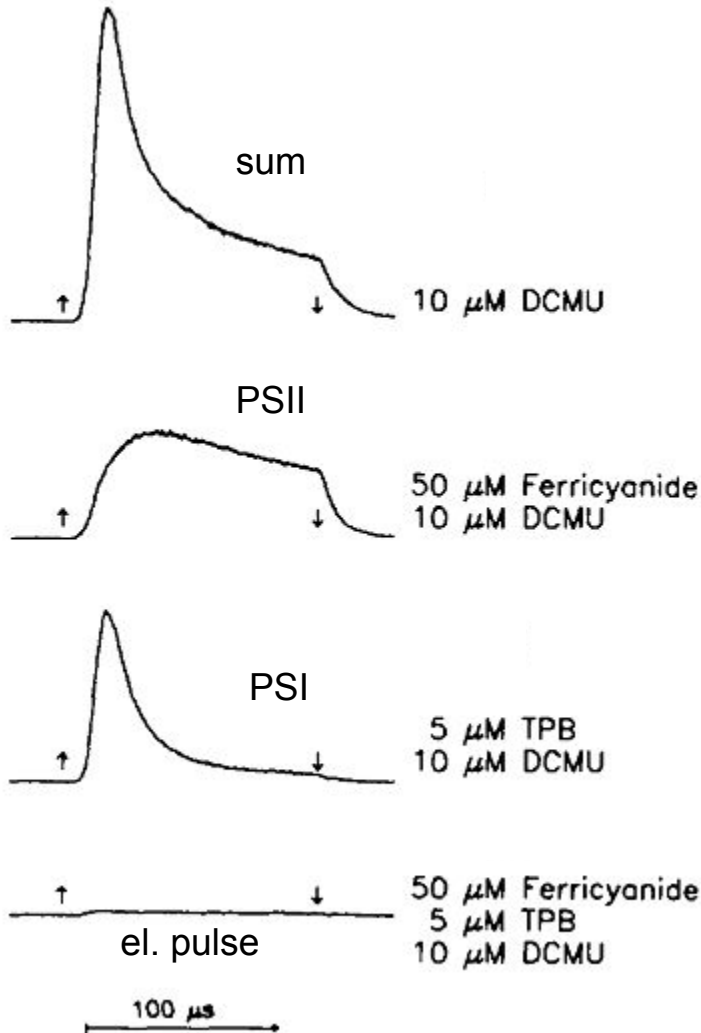


За время ПД  $\sim 1$  мс конц-ии ионов внутри и снаружи не изменяются, значения эдс  $\varphi_{Na}$  и  $\varphi_K$  – константы, так как уровни  $K^+$  и  $Na^+$  высоки:  $[K^+]_i \sim 100$  мМ и  $[Na^+]_i \sim 10$  мМ.

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