

УДК 577.34

ПЕРЕНОС ЭЛЕКТРОНА НА ДОНОРНОЙ СТОРОНЕ ФОТОСИСТЕМЫ 2, ЛИШЕННОЙ ИОНОВ МАРГАНЦА*

© 2019 Л.А. Витухновская^{1,2}, Е.В. Федоренко³, М.Д. Мамедов^{1**}

¹ НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
119992 Москва, Россия; электронная почта: mahirmamedov@yandex.ru

² Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН,
119334 Москва, Россия

³ Московский физико-технический институт,
141701 Долгопрудный, Московская обл., Россия

Поступила в редакцию 10.04.2019

После доработки 05.06.2019

Принята к публикации 05.06.2019

После удаления ионов марганца, ответственных за светозависимое расщепление воды, редокс-активный аминокислотный остаток тирозина Y_Z (тирозин-161 субъединицы D1) по-прежнему остается основным донором электронов для фотоокисленного хлорофилла P_{680} (P_{680}^+) в реакционном центре фотосистемы 2 (ФС2). Изучено восстановление P_{680}^+ в результате переноса электрона от Y_Z при однократном срабатывании ядерного комплекса ФС2, лишенного ионов марганца (апо-ФС2), в присутствии слабых кислот и NH_4Cl . С помощью кинетического анализа светоиндуцированных абсорбционных изменений при 830 нм (отражающих редокс-переходы P_{680}) и pH 6,0 было показано, что восстановление P_{680}^+ хорошо аппроксимируется двумя кинетическими компонентами с характерными временами (τ) ~7 и 31 мкс и относительными вкладами ~54 и 37% соответственно. В отличие от незначительного влияния формиата натрия (200 мМ), добавление ацетата натрия и хлорида аммония увеличивало скорость переноса электронов между Y_Z и P_{680}^+ в ~5 раз. Предположение о том, что прямой перенос электрона от Y_Z к P_{680}^+ имеет двухфазную кинетику, которая, вероятно, отражает наличие двух разных популяций центров ФС2, подтверждается данными, полученными с помощью прямого электрометрического метода на протеолипосомах с апо-ФС2. Продemonстрировано, что субмиллисекундная двухфазная кинетика дополнительной электрогенной фазы в кинетике фотоэлектрического ответа, обусловленная переносом электрона между Y_Z и P_{680}^+ , значительно ускоряется в присутствии ацетата или аммония. Полученные результаты важны для понимания механизма взаимодействия между экзогенными соединениями (включая синтетические марганецсодержащие), способными осуществлять фоторазложение молекулы воды, и окисленным тирозином Y_Z в комплексах ФС2, лишенных марганцевого кластера.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: фотосистема 2, реакционный центр, апо-ФС2, абсорбционные изменения, фотоэлектрический ответ, ацетат, аммоний.

DOI: 10.1134/S0320972519090082

В тилакоидных мембранах цианобактерий и хлоропластов светозависимое окисление молекулы воды и восстановление пластохинона осуществляются реакционным центром (РЦ) фотосистемы 2 (ФС2). Структура димерной формы

комплексов ФС2 из термофильных цианобактерий была определена с помощью рентгеноструктурного анализа с атомным разрешением 1,9 Å [1–3]. Каждый мономер ФС2 содержит 20 белковых субъединиц (молекулярная масса 350 кДа), 17 из которых являются мембранными белками. При этом все основные функциональные кофакторы локализованы в интегральных антенных белках CP43 и CP47 и субъединицах РЦ D1 и D2. Комплекс окисления воды (КОВ) ФС2, состоящий из неорганического кластера Mn_4CaO_5 и окружающего белкового матрикса, расположен на люменальной стороне тилакоидной мембраны. Отметим, что три периферические мембранные субъединицы, также локализованные на донорной стороне РЦ, взаимодей-

Принятые сокращения: апо-ФС2 – комплексы ФС2, лишенные ионов марганца; КОВ – комплекс окисления воды; ФС2 – фотосистема 2; РЦ – реакционный центр; Q_A – первичный хинонный акцептор; Y_Z – тирозин-161 субъединицы D1; τ – характерное время; $\Delta\psi$ – трансмембранная разность электрических потенциалов.

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya>, в рубрике «Papers in Press», BM19-114, 29.07.2019.

** Адресат для корреспонденции.

ствуют с белками D1/D2 и стабилизируют кластер Mn_4CaO_5 .

Энергия света, поглощаемая пигментами антенного комплекса, передается на РЦ, где происходят реакции переноса заряда с участием редокс-кофакторов. Разделение зарядов между первичным донором электрона P_{680} и промежуточным электронным акцептором феофитином ($P_{680}^+Phe^-$) стабилизируется в результате дальнейшего переноса электрона к прочносвязанной молекуле пластохинона Q_A , за которым следует реокисление Q_A^- вторичным лабильно-связанным хинонным акцептором Q_B . Редокс-активный тирозиновый остаток Y_Z (тирозин-161 субъединицы D1), локализованный между КОВ и P_{680} , осуществляет сопряжение одноэлектронной фотохимической реакции с четырехэлектронным каталитическим процессом окисления воды [4–6]. В препаратах ФС2 с активным КОВ Y_Z передает электрон фотоокисленному P_{680} во временном диапазоне от десятков до нескольких сотен наносекунд, образуя радикал Y_Z^{\cdot} . При этом быстрое высвобождение протона происходит при окислении Y_Z , который сопряжен с остатком H190 в субъединице D1 РЦ [5–7]. Восстановление Y_Z^{\cdot} путем переноса электрона от КОВ происходит во временном диапазоне от десятков микросекунд до нескольких миллисекунд, в зависимости от S-перехода КОВ.

Когда КОВ инактивирован в результате удаления Mn_4CaO_5 -кластера (препараты «апо-ФС2»), реакция переноса электрона между Y_Z и фотоокисленным P_{680} замедляется; при этом зависимость скорости от pH, кинетические эффекты дейтерия и энергия активации существенно отличаются от этих параметров в нативных препаратах ФС2 [4, 5]. Ряд данных, полученных на препаратах апо-ФС2, позволяет предположить, что Y_Z находится в неупорядоченной среде, подверженной воздействию растворителя [5, 7]. Считается, что изменение диэлектрических свойств повышает энергию реорганизации, что, в свою очередь, уменьшает скорость переноса электронов на 2–3 порядка по сравнению с интактными комплексами ФС2 [4, 8–10]. Кроме того, известно, что экстракция ионов марганца из КОВ ингибирует перенос электронов с Q_A на Q_B , возможно, путем сдвига среднеточечного потенциала Q_A в сторону более положительного значения [11–14]. Ингибирование реакции на акцепторной стороне РЦ способствует рекомбинации электрона с «дыркой» в состоянии $Q_A^-P_{680}^+$.

Следует отметить, что комплекс ФС2, лишенный кластера Mn_4CaO_5 , а также трех периферических белков, служит основой для понимания функциональной роли отдельных неорга-

нических кофакторов, вовлеченных в процесс разложения молекулы воды; механизмов сборки неорганического ядра (фотоактивация КОВ); механизмов реконструкции КОВ в присутствии различных синтетических соединений марганца; роли внешних белков ФС2; механизма фотоингибирования РЦ ФС2; степени эффективности экзогенного донора и акцептора электронов *in vitro* и т.д.

Редокс-активный тирозин Y_Z обычно рассматривают как часть одноэлектронной «проводки», а не как часть пентаметаллического Mn_4CaO_5 -кластера [4–6]. В связи с этим важно знать природу белкового окружения Y_Z и механизмы его взаимодействия с молекулами воды и марганцевым кластером в ФС2. В настоящей работе для выявления особенностей функционирования Y_Z было изучено влияние различных низкомолекулярных соединений, таких как ацетат натрия, хлорид аммония, формиат натрия и азид натрия, на перенос электронов между Y_Z и P_{680}^+ в комплексах апо-ФС2 с помощью импульсной оптической спектроскопии (измерение абсорбционных изменений при 830 нм) и прямого электрометрического метода (измерение светоиндуцированных фотоэлектрических ответов) [15, 16]. Полученные данные свидетельствуют о двухфазной электрогенной природе реакции переноса электрона между Y_Z к P_{680}^+ , значительно ускоряющейся в присутствии ацетата натрия и хлорида аммония.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выделение ядерных комплексов ФС2 из коммерческого шпината *Spinacia oleracea* проводили по методике, описанной в работе Naag et al. [17], путем обработки мембранных фрагментов додецил- β -D-мальтозидом (соотношение детергент/хлорофилл 10 : 1) в течение 1 ч с последующим центрифугированием в течение 16 ч при 4 °C и 145 000 g (Spinco L2 65B, ротор SW-28) в градиенте плотности (20–40%) сахарозы.

Для получения препаратов ФС2, лишенных ионов марганца, кальция и трех периферических белков, интактные ядерные комплексы ФС2 (содержание хлорофилла 0,5 мг/мл) инкубировали в 0,8 М Tris-HCl-буфере (pH 8,3) в течение 30 мин при 23 °C с последующим трехкратным промыванием буфером (50 мМ Mes, pH 6,0) [18].

Для приготовления протеолипосом суспензию азолектина (20 мг/мл, тип IVS, содержание фосфатидилхолина 40%) растворяли в 50 мМ Hepes-NaOH-буфере (pH 7,5), содержащем 1,4% октил- β -D-глюкопиранозид, и обрабатывали ультразвуком (22 кГц, 60 μ A) в течение

2 мин. Полученный прозрачный раствор липида смешивали с комплексами апо-ФС2 при соотношении липид/белок 50 : 1 в течение 30 мин в темноте. Гель-хроматографию на колонке с сефадексом G-50 использовали для удаления дегерента.

Светоиндуцированные абсорбционные изменения при 830 нм регистрировали с использованием однолучевого дифференциального спектрофотометра, сконструированного в отделе биоэнергетики НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ. В качестве источника измерительного света использовали лазерный диод, излучающий свет с длиной волны 830 нм, в качестве источника действующего света – лазер Nd-YAG («Quantel», Франция; длина волны 532 нм, длительность импульса 12 нс, интенсивность вспышки 50 мДж).

Генерацию трансмембранной разности электрических потенциалов ($\Delta\psi$) измеряли с помощью прямого электрометрического метода, как описано в работе Drachev et al. [16]. Образование $\Delta\psi$ между разделенными коллоидной фосфолипидной мембраной отсеками ячейки регистрировали с помощью пары защищенных от света хлор-серебряных (Ag/AgCl) электродов, расположенных по разные стороны от мембраны. В качестве источника света использовали лазер Nd-YAG («Quantel», Франция).

Кинетический анализ сигналов проводили при помощи программы Pluk [19] и Origin Program Package («OriginLab Corporation», США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В ядерных комплексах ФС2, лишенных ионов марганца, восстановление фотоокисленного P_{680} может происходить разными путями: 1) путем прямого переноса электрона от редокс-активного тирозина Y_Z ; 2) в результате рекомбинации зарядов между P_{680}^+ и первичным хинонным акцептором Q_A^- ; 3) путем переноса электрона от цитохрома b_{559} или тирозина Y_D [10, 20]. В этих препаратах, как отмечено выше, Y_Z является основным донором электронов для P_{680}^+ , но теперь Y_Z восстанавливается в результате рекомбинации зарядов $Y_Z^+Q_A^-$, а не электроном от марганцевого кластера. В апо-комплексах ФС2 цитохром b_{559} и/или тирозин Y_D находится в окисленной форме, поэтому третий путь восстановления P_{680}^+ не реализуется [20].

Образование стабильной радикальной пары ($P_{680}^+Q_A^-$) и кинетику переноса электрона от Y_Z к P_{680}^+ можно регистрировать, измеряя светоиндуцированные абсорбционные изменения при 830 нм,

ΔA_{830} , отражающие редокс-состояния P_{680} [10, 21–23]. Рис. 1 демонстрирует индуцированные вспышкой лазера абсорбционные изменения при 830 нм адаптированных к темноте (10 мин) препаратов ФС2, лишенных ионов марганца, в отсутствие (кривая 1) и в присутствии (кривая 2) 1 мМ феррицианида калия при pH 6,0.

Важно отметить, что в серии 11–15 лазерных вспышек амплитуда и кинетика фотоиндуцированного оптического сигнала при 830 нм сохраняются практически неизменными. Это позволяет сделать заключение о том, что исходное состояние реакционного центра $Y_ZP_{680}Q_A$ полностью регенерируется в течение темнового интервала между вспышками (5 с). Такой вывод находится в соответствии с данными литературы, указывающими на время рекомбинации пары $Y_Z^+Q_A^-$ (от нескольких десятков до нескольких сотен миллисекунд) [7, 23, 24]. Как видно на рис. 1 (кривая 2), в присутствии 1 мМ феррицианида калия амплитуда фотоиндуцированного сигнала ΔA_{830} увеличивалась на 35%. Этот эффект, скорее всего, объясняется тем, что в исходном препарате апо-ФС2 первичный акцептор Q_A восстановлен в части РЦ, и, соответственно, первичная фотоиндуцированная пара $P_{680}^+Q_A^-$ не образуется.

Исследование кинетики релаксации сигнала, которая отражает восстановление P_{680}^+ , про-

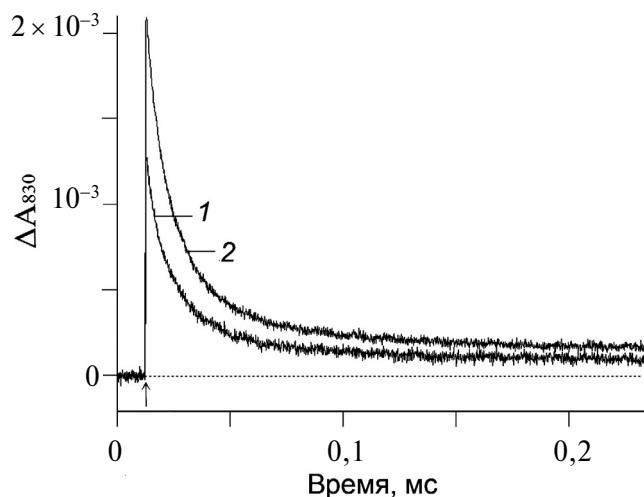


Рис. 1. Изменения поглощения при 830 нм, индуцированные ненасыщенными лазерными вспышками в комплексах апо-ФС2, которые указывают на окисление (нарастание) и восстановление (спад) P_{680} в отсутствие (1) и в присутствии 1 мМ феррицианида калия (2). Концентрация хлорофилла – 20 мкг/мл, временной интервал между единичными вспышками лазера – 5 с. Каждая кривая была получена путем усреднения 11–15 кривых. Среда инкубации: 50 мМ Mes (pH 6,0), 15 мМ NaCl, 0,35 М сахарозы, 0,025%-ный додецилмальтозид. Стрелки здесь и далее указывают на момент времени, в который происходила вспышка лазера

Влияние ацетата натрия и хлорида аммония на кинетику рекомбинации сигнала ΔA_{830}

Концентрация, мМ	CH ₃ COONa		NH ₄ Cl	
	время, мкс	амплитуда, %	время, мкс	амплитуда, %
25	5	58		
	17	34		
50	5	74	4	36
	16	22	17	54
100	1	60	6	27
	9	35	13	62
200	1	70	1,4	27
	7	23	9	62
250			1,3	32
			7	59

Примечание. Данные представлены для контрольных образцов (без добавок) с двумя кинетическими компонентами, характеризующимися характерными временами $\tau_1 \sim 7$ и $\tau_2 \sim 31$ мкс и относительными вкладами ~ 54 и 37% соответственно. Время (мкс) отражает скорости восстановления фотоокисленного P_{680} от тирозина Y_Z , а амплитуды отдельных кинетических фаз (%) – относительные вклады фаз в кинетику спада оптического сигнала.

демонстрировало наличие двух экспоненциальных компонент с характерными временами (τ) ~ 7 и 31 мкс и амплитудами ~ 54 и 37% соответственно (рис. 1, кривая 2; таблица). Эти компоненты отражают прямой перенос электрона от тирозина Y_Z к P_{680}^+ [5, 10, 24] и позволяют предположить наличие двух различных популяций центров ФС2, вероятно, отличающихся друг от друга характером взаимодействия между Y_Z и H190 (см. обсуждение ниже).

На рис. 2 представлены результаты изучения влияния слабых кислот и NH_4Cl на кинетику переноса электрона между Y_Z и P_{680}^+ в образцах апо-ФС2 в растворе (в присутствии 0,03% детергента). На рис. 2, а показано влияние ацетата натрия на светоиндуцированные абсорбционные изменения при 830 нм, которые отражают окисление (нарастание) и восстановление (спад) P_{680} . Кинетический анализ спада сигнала ΔA_{830} показал наличие экспоненциальных компонент с $\tau_1 \sim 5$ мкс и $\tau_2 \sim 16$ мкс при добавлении 50 мМ ацетата натрия (кривая 2) и $\tau_1 \sim 1$ мкс и $\tau_2 \sim 7$ мкс при добавлении 200 мМ ацетата натрия (кривая 3). Таким образом, перенос электрона от тирозина Y_Z к P_{680}^+ ускоряется при увеличении концентрации ацетата натрия (таблица).

Влияние NH_4Cl на реакцию переноса электрона на донорной стороне комплексов апо-ФС2 показано на рис. 2, б. Видно, что добавление 50 мМ NH_4Cl (кривая 2) ускоряло спад сигнала ΔA_{830} , который характеризуется временами $\tau_1 \sim 4$ мкс и $\tau_2 \sim 17$ мкс (таблица). Как и в случае с ацетатом натрия, дальнейшее увеличение концентрации NH_4Cl (кривая 3) в среде инкубации привело к

увеличению скорости переноса электронов с Y_Z на P_{680}^+ (таблица). Следует отметить, что использование большой концентрации NH_4Cl может приводить к развитию побочных эффектов, вызванных анионами Cl^- , которые появляются в результате диссоциации этого соединения. Такие эффекты были изучены ранее в случае мембранных фрагментов ФС2 с функционально-активным КОВ [25, 26]. В случае препаратов ФС2, лишенных КОВ и трех периферических белков (образцы, обработанные Tris-HCl), добавление NaCl в концентрации до 400 мМ в среде инкубации не влияло на кинетику спада оптического сигнала (данные не приведены). Полученные результаты свидетельствуют о том, что наблюдаемое ускорение кинетики оптического сигнала в присутствии NH_4Cl обусловлено влиянием аммония (см. далее). Отметим, что при одинаковых скоростях восстановления фотоокисленного P_{680} от тирозина Y_Z относительный вклад фаз в кинетику спада оптического сигнала различен в присутствии ацетата натрия и хлорида натрия (таблица). Однако в настоящее время однозначное объяснение этого различия отсутствует.

Влияние другой слабой кислоты, формиата, на кинетику сигнала ΔA_{830} , отражающее восстановление фотоокисленного P_{680} в результате переноса электрона от тирозина Y_Z , показано на рис. 2, в. Добавление формиата натрия до концентрации 200 мМ никак не влияло на кинетику спада (кривая 1), в то время как при концентрации 250 мМ наблюдалось ее ускорение, но в меньшей степени (кривая 2).

Добавление азида натрия до концентрации 50 мМ не влияло на амплитуду и кинетику спада сигнала ΔA_{830} (рис. 2, *з*, кривая 1), в то время как при большей концентрации (100 мМ) наблюдалось значительное падение амплитуды сигнала без изменения кинетики спада (рис. 2, *з*, кривая 2). Вероятно, в этих условиях может не происходить полного восстановления P_{680}^+ в интервале между вспышками.

Влияние вышеперечисленных экзогенных соединений на прямой перенос электрона между тирозином Y_Z и фотоокисленным P_{680} было также изучено с помощью прямого электрометрического метода. На рис. 3, *а* показаны фотоэлектрические сигналы комплексов апо-ФС2, реконструированных в фосфолипидную липосомальную мембрану, в ответ на единичные лазерные вспышки. Светозависимый перенос зарядов в РЦ сопровождается образованием трансмембранной разности электрических потенциалов. Отрицательный знак $\Delta\psi$ указывает на то, что донорная сторона РЦ ФС2 расположена на внешней поверхности протеолипосомальной мембраны [18, 27, 28]. Именно такая асимметричная ориентация (> 90%) апо-ФС2 в липосомах позволяет изучить механизм взаимодействия между Y_Z и экзогенными соединениями при однократном срабатывании РЦ с по-

мощью электрометрии. В препаратах апо-ФС2 вспышка света приводит к образованию $\Delta\psi$, обусловленной разделением зарядов РЦ между P_{680} и Q_A , за которым следует перенос электрона от редокс-активного тирозина Y_Z к P_{680}^+ . Наблюдаемый спад фотоэлектрического ответа обусловлен рекомбинацией зарядов между Q_A^- и Y_Z (рис. 3, *а*). Помимо быстрой фазы генерации $\Delta\psi$, обусловленной разделением зарядов между P_{680} и Q_A , в кинетике генерации $\Delta\psi$ наблюдается дополнительная миллисекундная электрогенная фаза (~17% от общей амплитуды), обусловленная электрогенным восстановлением P_{680}^+ от тирозина Y_Z (рис. 3, *б*, кривая 1). Кинетический анализ этой дополнительной электрогенной фазы выявил компоненты с $\tau_1 \sim 1$ и $\tau_2 \sim 14$ мкс с равными вкладами. При этом разница в скорости реакции переноса электрона от Y_Z к P_{680}^+ между комплексом апо-ФС2, встроенным в липосомальную мембрану (электрометрические данные), и апо-ФС2 в растворе с детергентом (оптические данные), вероятно, связана с действием липидов в протеолипосомах, которые способствуют оптимальной конформации для эффективного функционирования РЦ ФС2 [28, 29]. Здесь же хотелось отметить, что с помощью прямого электрометрического метода можно выявить не только кинетики отдельных электроген-

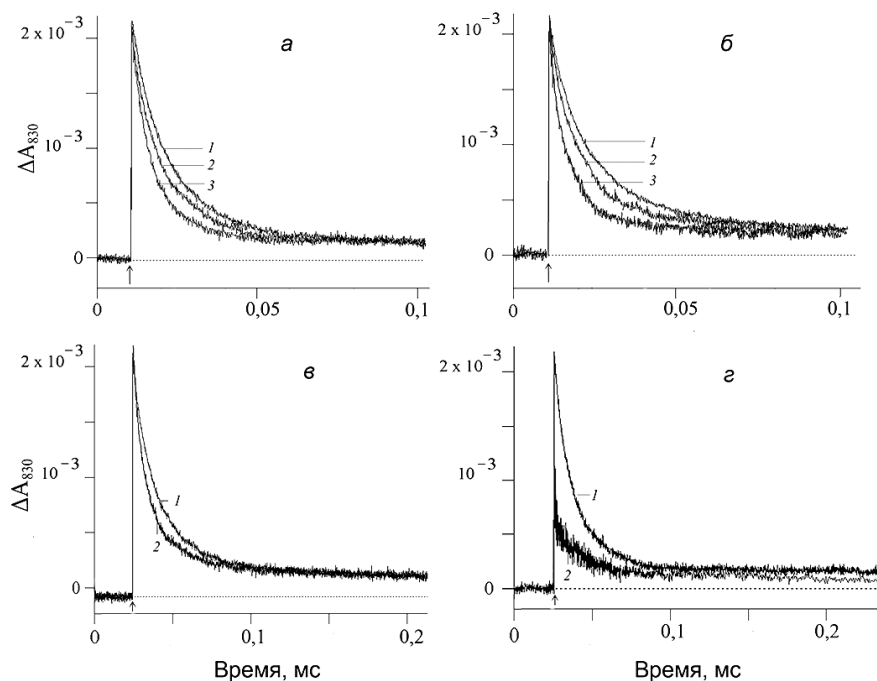


Рис. 2. Изменения поглощения при 830 нм, индуцированные ненасыщенными лазерными вспышками в комплексах апо-ФС2: *а* – в отсутствие (1) и в присутствии 50 мМ (2) и 200 мМ (3) ацетата натрия; *б* – в отсутствие (1) и в присутствии 50 мМ (2) и 250 мМ (3) NH_4Cl ; *в* – в присутствии 200 мМ (1) и 250 мМ (2) формиата натрия; *з* – в присутствии 50 мМ (1) и 100 мМ (2) азида натрия. Условия – как на рис. 1

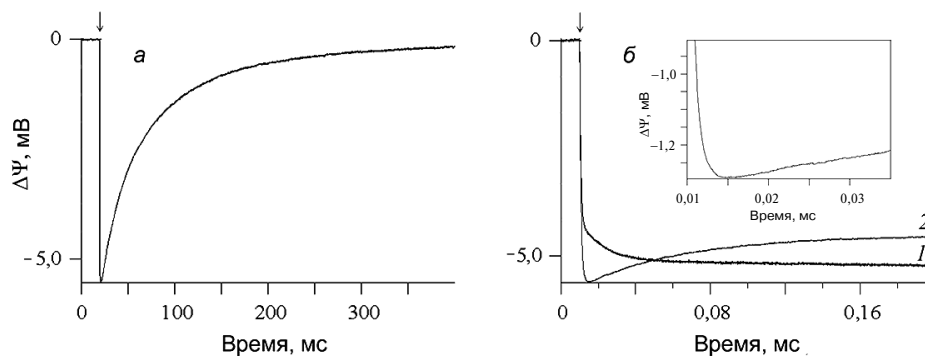


Рис. 3. *a* – Фотоэлектрический ответ, индуцированный вспышкой лазера, в протеолипосомах, содержащих апо-КОВ; *б* – фотоэлектрические ответы в отсутствие (1) и в присутствии 250 мМ NH_4Cl (2). Врезка показывает увеличенный начальный участок кривой 2 для выявления быстрой фазы. Условия – как на рис. 1

ных реакций в РЦ ФС2, но также и расстояния между редокс-центрами [24, 28].

Добавление 250 мМ NH_4Cl (рис. 3, *б*, кривая 2) к инкубационной среде привело к изменению кинетики дополнительной субмиллисекундной фазы нарастания $\Delta\Psi$, что может быть связано со значительным ускорением скорости переноса электрона между Y_Z и P_{680}^+ в протеолипосомах с апо-ФС2. Аналогичный эффект наблюдался в присутствии 200 мМ ацетата натрия (данные не приведены). Если представить, что кинетика переноса электрона, как в случае апо-ФС2 в растворе в присутствии ацетата или аммония, ускоряется в 5 раз, то в аналогичных условиях в протеолипосомах кинетические компоненты с характерными временами 1 и 14 мкс могут оказаться намного короче, ~0,2 и 3 мкс. Кинетическим анализом удается выявить только медленную (3 мкс) компоненту (см. врезку). Следует отметить, что временное разрешение прямого электрометрического метода составляет ~0,20–0,25 мкс.

Таким образом, данные, полученные с помощью прямого электрометрического метода, подтверждают наличие двух кинетических компонент реакции $Y_Z \rightarrow P_{680}^+$, наблюдаемых в микросекундном диапазоне с помощью импульсной абсорбционной спектроскопии по сигналу ΔA_{830} .

Несколько слов о структурных особенностях: удаление кластера Mn_4CaO_5 не приводит к заметному движению субъединиц CP43, CP47, D1, D2 или доменов ни в донорной области, ни в области α -спиралей, пронизывающих мембрану, ни с акцепторной стороны ФС2 [30]. Небольшие структурные изменения в препаратах апо-ФС2 наблюдаются только на участке белка вблизи кластера Mn_4CaO_5 . С другой стороны, также известно, что свойства Y_Z в комплексах ФС2, лишенных марганцевого кластера, могут радикально отличаться от таковых в интактной

ФС2 [4, 10, 18]. Считается, что в таких препаратах Y_Z расположен в гидрофильном окружении и контактирует с водной фазой. При этом некоторые вещества (марганец, аскорбат, 1,5-дифенилкарбазид, бензидин, гидроксилламин, гидразин), а также ряд редокс-медиаторов (N,N,N',N' -тетраметил-*n*-фенилендиамин, 2,3,5,6-тетраметил-*n*-фенилендиамин, 2,6-дихлорфенилиндофенол, феназинметосульфат) обладают способностью выступать в роли доноров электронов для окисленного Y_Z в отсутствие марганцевого кластера [28].

Что касается соединений, используемых в представленной работе, следует отметить следующее: ацетат (CH_3COO^-) в белковой глобуле ФС2 связывается с негемовым железом на акцепторной стороне, а также на донорной стороне между Mn-кластером и Y_Z [26, 31]. В этих условиях наблюдается замедление реакций переноса электрона между Q_A и Q_B и восстановление Y_Z^+ (особенно переход $S_2Y_Z^+ \rightarrow S_3Y_Z$). Замедление реакции на акцепторной стороне РЦ, вероятно, обусловлено нарушением путей протонирования дважды восстановленной формы Q_B (Q_B^{2-}). Методом измерения модуляции сигнала электронного спинового эха в образцах апо-ФС2 не было выявлено связи между Y_Z^+ и ацетатом [32], однако это не исключает влияния ацетата на близлежащее окружение Y_Z -H190.

Двойной электрон-электронный резонанс, детектируемый методом ЯМР, показал, что при pH 7,5 в NH_4Cl -обработанных ядерных комплексах ФС2 из цианобактерий NH_3 связывается в качестве терминального лиганда с Mn_4 в КОВ [33, 34]. Следует отметить, что NH_4Cl при нейтральных и кислых значениях pH находится в основном в форме NH_4^+ , в то время как в относительно гидрофобной части белка апо-ФС2 (в частности, вблизи тирозина Y_Z) присутствуют нейтральные молекулы NH_3 [35, 36]. Что касается

концентрации NH_3 в используемой нами среде, то, исходя из расчета степени протолиза реакции $\text{NH}_4^+ + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NH}_3 + \text{H}_3\text{O}^+$, она составляет ~ 25 мкМ (концентрация РЦ в случае оптических измерений в растворе составляет $\sim 0,4$ мкМ, а в случае протеолипосом $\sim 0,04$ мкМ). Кроме того, рК для NH_4Cl (рК $_{\alpha}$ 9,24) в среде измерения может быть сдвинута в кислую сторону, и, соответственно, концентрация NH_3 может быть еще больше.

Известно, что при добавлении еще одной небольшой карбоновой кислоты – формиата, как и в случае ацетата, происходит замедление реакции переноса электрона между Q_A и Q_B и восстановление Y_Z [31]. В отличие от CH_3COO^- и NH_3 , данные, полученные на Mn-лишенных мембранных фрагментах ФС2 и ядерных комплексах ФС2 с использованием ^{13}C -формиата, и сравнение спектров Y_D/Y_D с помощью ИК-Фурье спектроскопии позволили предположить, что формиат, возможно, связывается вблизи Arg294 в субъединице D2 и существенно влияет на свойства Y_D [37]. Однако влияние формиата, хотя и в меньшей степени по сравнению с ацетатом или аммонием, на кинетику спада сигнала ΔA_{830} при концентрации 250 мМ может свидетельствовать в пользу его участия в процессе депротонирования на участке Y_Z –H190.

Отсутствие влияния азида (N_3^-/HN_3) на кинетику переноса электрона на донорной стороне апо-ФС2 не может быть однозначно объяснено. Можно предполагать, что радикал N_3^- , который является ингибитором реакции переноса электрона между Y_Z и Q_A в ФС2, обработанной Tris-HCl, не формируется в условиях одиночного оборота фермента [38].

Следует отметить, что несмотря на близкие значения рК для ацетата натрия (4,75), азидата натрия (4,6) и формиата натрия (3,75), влияние этих соединений на кинетику реакции переноса электрона на донорной стороне РЦ, а именно между Y_Z и фотоокисленным P_{680} , является различным, в то время как действие ацетата натрия (рК 4,75) и хлорида аммония (рК $_{\alpha}$ 9,24) – схожим. Вероятно, существенную роль играют структурные особенности каждого из этих соединений.

Как было указано выше, перенос электрона от редокс-активного остатка тирозина Y_Z к фотоокисленному P_{680} сильно замедляется при удалении ионов марганца из комплекса ФС2. Одним из возможных объяснений является разрыв водородной связи между тирозином Y_Z и аминокислотным остатком H190. Сильная водородная связь длиной 2,4 Å [3] существует между Y_Z и H190 в субъединице D1 в препаратах ФС2 с активным комплексом окисления воды, в то время как для препаратов апо-ФС2 длина водородной

связи между Y_Z и H190 составляет 2,8 Å. Кроме того, было показано [39, 40], что в образцах апо-ФС2 кольцо Y_Z становится более подвижным в связи с появлением доступности молекул воды вокруг тирозина. Поскольку Y_Z протонируется в восстановленном состоянии и депротонируется в окисленном состоянии (Y_Z^+), окисление этого тирозина включает перенос как электрона, так и протона. Скорость окисления Y_Z увеличивается с ростом рН, и предполагается, что H190 при низких значениях рН протонирован и должен быть депротонирован прежде, чем сможет принять протон от Y_Z [7]. Nays et al. [7, 41] предполагают, что окисление Y_Z при низких значениях рН может быть объяснено тем, что Y_Z^+ имеет несколько H-связывающих партнеров.

Таким образом, в препаратах ФС2, лишенных ионов марганца, CH_3COO^- и NH_3 способны ускорять восстановление P_{680} , возможно, принимая протон при окислении Y_Z [7, 41]. Ранее было показано [7], что небольшие органические основания, такие как имидазол или этанол-амин, сдвигающие значение рК для Y_Z в комплексах ФС2 из мутанта D1-H190 цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803, способны принимать фенольный протон, тем самым эти соединения стимулируют быстрое восстановление P_{680}^+ . Ускорение восстановления P_{680}^+ замещенными имидазолами, гистидином, Tris-HCl и 1,4-диазабипиридином также наблюдалось в апо-ФС2-частицах из цианобактерии дикого типа [41].

Двухфазная природа дополнительной электрогенной фазы ($\tau_1 \sim 1$ мкс и $\tau_2 \sim 14$ мкс при рН 6,0) в кинетике фотоэлектрического ответа ($\sim 17\%$ от общей электрогенной фазы) (рис. 3, б, кривая 1) позволяет предположить, что существуют две популяции РЦ, отличающиеся друг от друга характером взаимодействия между Y_Z и H190. В препаратах ФС2, лишенных марганцевого кластера, тирозин Y_Z находится в более гидрофильном окружении, и вокруг Y_Z^+ может образовываться сеть дополнительных водородных связей, в отличие от Y_D [39, 42–44]. Отметим, что прямая электрометрия – чувствительный метод, который позволяет регистрировать кинетику внутрибелкового переноса заряда на расстояние $> 0,5$ Å в направлении, перпендикулярном плоскости мембраны, и определять относительный вклад отдельных электрогенных реакций (дизлектрически-взвешенные расстояния между кофакторами) в суммарную $\Delta\psi$ [16, 24, 27]. Поэтому следует отметить, что обе эти компоненты (τ_1 и τ_2) с равным вкладом в дополнительную электрогенную фазу обусловлены векторным электрогенным переносом электрона между Y_Z и P_{680}^+ . Ранее Nays et al. [7] предполо-

жили, что более медленные субмиллисекундные фазы восстановления P_{680}^+ отражают депротонирование D1-H190 в РЦ.

Стимуляция скорости переноса электрона между Y_Z и P_{680}^+ в образцах ФС2 с неактивным КОВ ацетатом (CH_3COO^-) и NH_3 (настоящая работа), а также в присутствии органических оснотаний, таких как имидазол, гистидин или этаноламин [7, 41], в зависимости от концентрации свидетельствует в пользу связывания этих молекул вблизи домена Y_Z -H190 в белковой глобуле. Очевидно, что все эти соединения, которые отличаются друг от друга по размеру молекул и химической структуре, способны взаимодействовать с Y_Z или H190 в качестве протонного «акцептора».

Таким образом, двухфазная кинетика реакции восстановления P_{680}^+ на донорной стороне реакционного центра была впервые выявлена с помощью оптической спектроскопии и электрометрии. Полученные данные важны для понимания механизма взаимодействия между эк-

зогенными соединениями (включая синтетические марганец-содержащие), способными осуществлять фоторазложение воды, и окисленным тирозином Y_Z в комплексах ФС2, лишенных марганцевого кластера.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект 17-14-01323) и Российского фонда фундаментальных исследований (АААА-А19-119012990175-9) в рамках госзадания «Химико-физические механизмы взаимодействия интенсивного лазерного излучения с биологическими системами».

Благодарности. Авторы работы выражают благодарность за обсуждение результатов и ценные комментарии А.Ю. Семенову.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей и использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ferreira, K.N., Iverson, T.M., K. Maghlaoui., Barber, J., and Iwata, S. (2004) Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving center, *Science*, **303**, 1831–1838, doi: 10.1126/science.1093087.
2. Guskov, A., Kern, J., Gabdulkhakov, A., Broser, M., Zouni, A., and Saenger, W. (2009) Cyanobacterial photosystem II at 2.9-Å resolution and the role of quinones, lipids, channels and chloride, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **16**, 334–342, doi: 10.1038/nsmb.1559.
3. Umena, Y., Kawakami, K., Shen, J.-R., and Kamiya, N. (2011) Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at a resolution of 1.9 Å, *Nature*, **473**, 55–60, doi: 10.1038/nature09913.
4. Tommos, C., and Babcock, G.T. (2000) Proton and hydrogen currents in photosynthetic water oxidation, *Biochim. Biophys. Acta*, **1458**, 199–219, doi: 10.1016/S0005-2728(00)00069-4.
5. Renger, G. (2004) Coupling of electron and proton transfer in oxidative water cleavage in photosynthesis, *Biochim. Biophys. Acta*, **1655**, 195–204, doi: 10.1016/j.bbabi.2003.07.007Get.
6. Styring, S., Sjöholm, J., and Mamedov, F. (2012) Two tyrosines that changed the world: Interfacing the oxidizing power of photochemistry to water splitting in photosystem II, *Biochim. Biophys. Acta*, **1817**, 76–87, doi: 10.1016/j.bbabi.2011.03.016.
7. Hays, A.M., Vassiliev, I.R., Golbeck, J.H., and Debus, R.J. (1999) Role of D1-His190 in the proton-coupled oxidation of tyrosine Y_Z in manganese-depleted photosystem II, *Biochemistry*, **38**, 11851–11865, doi: 10.1021/bi990716a.
8. Babcock, G.T., and Sayer, K. (1975) A rapid, light-induced transient in electron paramagnetic resonance signal II activated upon inhibition of photosynthetic oxygen evolution, *Biochim. Biophys. Acta*, **376**, 315–328, doi: 10.1016/0005-2728(75)90024-9.
9. Conjeaud, H., and Mathis, P. (1980) The effects of pH on the reductions kinetics of P-680 in Tris-treated chloroplasts, *Biochim. Biophys. Acta*, **590**, 353–359, doi: 10.1016/0005-2728(80)90206-6.
10. Buser, C.A., Thompson, L.K., Diner, B.A., and Brudvig, G.W. (1990) Electron-transfer reactions in manganese-depleted photosystem II, *Biochemistry*, **29**, 8977–8985, doi: 10.1021/bi00490a014.
11. Krieger, A., Rutherford, A.W., and Johnson, G.N. (1995) On the determination of redox midpoint potential of the primary quinone electron acceptor, Q_A , in photosystem II, *Biochim. Biophys. Acta*, **1229**, 193–201, doi: 10.1016/0005-2728(95)00002-Z.
12. Shibamoto, T., Kato, Y., Sugiura, M., and Watanabe, T. (2009) Redox potential of the primary plastoquinone electron acceptor Q_A in photosystem II from *Thermosynechococcus elongatus* determined by spectroelectrochemistry, *Biochemistry*, **48**, 10682–10684, doi: 10.1021/bi901691j.
13. Ido, K., Gross, G.M., Guerrero, F., Sedoud, A., Lai, T.L., Ifuku, K., Rutherford, A.W., and Krieger-Liszky, A. (2011) High and low potential forms of the Q_A quinone electron acceptor in photosystem II of *Thermosynechococcus elongatus* and spinach, *J. Photochem. Photobiol. B*, **104**, 154–157, doi: 10.1016/j.jphotobiol.2011.02.010.
14. Allakhverdiev, S.I., Tsuchiya, T., Watabe, K., Kojima, A., Los, D.A., Tomo, T., Klimov, V.V., and Mimuro, M. (2011) Redox potentials of primary electron acceptor quinone molecule (Q_A) and conserved energetics of photosystem II in cyanobacteria with chlorophyll *a* and chlorophyll *d*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 8054–8058, doi: 10.1073/pnas.1100173108.
15. Drachev, L.A., Jasaitis, A.A., Kaulen, A.D., Kondrashin, A.A., Liberman, E.A., Nemecek, I.B., Ostroumov, S.A., Semenov, A.Y., and Skulachev, V.P. (1974) Direct measurement of electric current generation by cytochrome oxidase, H^+ -ATPase and bacteriorhodopsin, *Nature*, **249**, 321–324, doi: 10.1038/249321a0.
16. Drachev, L.A., Kaulen, A.D., Semenov, A.Yu., Severina, I.I., and Skulachev, V.P. (1979) Lipid-impregnated filters as a

- tool for studying the electric current-generating proteins, *Anal. Biochem.*, **96**, 250–262, doi: 10.1016/0003-2697(79)90580-3.
17. Haag, E., Irrgang, K.-D., Boekema, E.J., and Renger, G. (1990) Functional and structural analysis of photosystem II core complexes from Haag spinach with high oxygen evolution capacity, *Eur. J. Biochem.*, **189**, 47–53, doi: 10.1111/j.1432-1033.1990.tb15458.x.
 18. Gupta, O.A., Tyunyatkina, A.A., Kurashov, V.N., Semenov, A.Y., and Mamedov, M.D. (2008) Effect of redox mediators on the flash-induced membrane potential generation in Mn-depleted photosystem II core particles, *Eur. Biophys. J.*, **37**, 1045–1050, doi: 10.1007/s00249-007-0231-6.
 19. Kalaidzidis, Ya.L., Gavrilov, A.V., Zaitsev, P.V., Kalaidzidis, A.L., and Korolev, E.V. (1997) PLUK – an environment for software development, *Program. Comput. Software*, **23**, 206–212.
 20. Kaminskaya, O., Kurreck, J., Irrgang, K.D., Renger, G., and Shuvalov, V.A. (1999) Redox and spectral properties of cytochrome *b559* in different preparations of photosystem II, *Biochemistry*, **38**, 16223–16235, doi: 10.1007/s00249-015-1082-1.
 21. Van Best, J.A., and Mathis, P. (1978) Apparatus for the measurement of small absorption change kinetics at 820 nm in the nanosecond range after a ruby laser flash, *Rev. Sci. Instrum.*, **49**, 1332, doi: 10.1063/1.1135579.
 22. Renger, G., Volker, M., and Weiss, W. (1984) Studies on the nature of the water-oxidizing enzyme. I. The effect of trypsin on the system II reaction pattern in inside-out thylakoids, *Biochim. Biophys. Acta*, **766**, 582–591, doi: 10.1016/0005-2728(84)90118-X.
 23. Gadjieva, R., Eckert, H.-J., and Renger, G. (2000) Photoinhibition as a function of the ambient redox potential in Tris-washed PS II membrane fragments, *Photosynth. Res.*, **63**, 237–248, doi: 10.1023/A:1006427408083.
 24. Semenov, A., Cherepanov, D., and Mamedov, M. (2008) Electrogenic reactions and dielectric properties of photosystem II, *Photosynth Res.*, **98**, 121–130, doi: 10.1007/s11120-008-9377-z.
 25. Tsuno, M., Suzuki, H., Kondo, T., Mino, H., and Noguchi, T. (2011) Interaction and inhibitory effect of ammonium cation in the oxygen evolving center of photosystem II, *Biochemistry*, **50**, 2506–2514, doi: 10.1021/bi101952g.
 26. Lovyagina, E.R., and Semin, B.K. (2016) Mechanism of inhibition and decoupling of oxygen evolution from electron transfer in photosystem II by fluoride, ammonia and acetate, *J. Photochem. Photobiol. B*, **158**, 145–153, doi: 10.1016/j.jphotobiol.2016.02.031.
 27. Haumann, M., Mulikidjanian, A., and Junge, W. (1997) Electrogenicity of electron and proton transfer at the oxidizing side of photosystem II, *Biochemistry*, **36**, 9304–9315, doi: 10.1021/bi963114p.
 28. Mamedov, M.D., Kurashov, V.N., Cherepanov, D.A., and Semenov, A.Yu. (2010) Photosystem II: where does the light-induced voltage come from? *Front. Biosci.*, **15**, 1007–1017, doi: 10.2741/3658.
 29. Petrova, I.O., Kurashov, V.N., Semenov, A.Yu., and Mamedov, M.D. (2011) Mn-depleted/reconstituted photosystem II core complexes in solution and liposomes, *J. Photochem. Photobiol. B*, **104**, 372–376, doi: 10.1016/j.jphotobiol.2011.03.004.
 30. Zhang, M., Bommer, M., Chatterjee, R., Hussein, R., Yano, J., Dau, H., Kern, J., Dobbek, H., and Zouni, A. (2017) Structural insights into the light-driven auto-assembly process of the water-oxidizing Mn₄CaO₅-cluster in photosystem II, *eLife*, **6**, e26933, doi: 10.7554/eLife.26933.
 31. Shevela, D., Klimov, V., and Messinger, J. (2007) Interactions of photosystem II with bicarbonate, formate and acetate, *Photosynth. Res.*, **94**, 247–264, doi: 10.1007/s11120-007-9200-2.
 32. Clemens, K.L., Force, D.A., and Britt, R.D. (2002) Acetate binding at the photosystem II oxygen-evolving complex: an S2-state multiline signal ESEEM study, *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 10921–10933, doi: 10.1021/ja012036c.
 33. Hou, L.-H., Wu, C.-M., Huang, H.-H., and Chu, H.-A. (2011) Effects of ammonia on the structure of the oxygen-evolving complex in photosystem II as revealed by light-induced FTIR difference spectroscopy, *Biochemistry*, **50**, 9248–9254, doi: 10.1021/bi200943q.
 34. Marchiori, D.A., Oyala, P.H., Debus, R.J., Stich, T.A., and Britt, R.D. (2018) Structural effects of ammonia binding to the Mn₄CaO₅ cluster of photosystem II, *J. Phys. Chem. B*, **122**, 1588–1599, doi: 10.1021/acs.jpcc.7b11101.
 35. Gerhard, V. (1980) The effect on ammonium chloride on the kinetics of the back reaction of photosystem II in *Chlorella fusca* and in chloroplasts in the Presence of 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea, *Z. Naturforsch.*, **35**, 451–460, doi: 10.1515/znc-1980-5-616.
 36. Kleiner, D. (1981) The transport of NH₃ and NH₄⁺ across biological membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, **639**, 41–52, doi: 10.1016/0304-4173(81)90004-5.
 37. Hienerwadel, R., Gourion-Arsiquaud, S., Ballottari, M., Bassi, R., Diner, B.A., and Berthomieu, C. (2005) Formate binding near the redox-active tyrosine D in photosystem II: consequences on the properties of tyrD, *Photosynth. Res.*, **84**, 139–144, doi: 10.1007/s11120-005-0637-x.
 38. Kawamoto, K., Mano, J., and Asada, K. (1995) Photoproduction of the azidyl radical from the azide anion on the oxidizing side of photosystem II and suppression of photooxidation of tyrosine Z by the azidyl radical, *Plant Cell Physiol.*, **36**, 1121–1129, doi: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a078856.
 39. Force, D.A., Randall, D.W., Britt, R.D., Tang, X.S., and Diner, B.A. (1995) 2H ESE-ENDOR study of hydrogen bonding to the tyrosine radicals Y_D[•] and Y_Z[•] of photosystem II, *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 10547–10554, doi: 10.1021/ja00155a032.
 40. Tommos, C., Tang, X.S., Warncke, K., Hoganson, C.W., Styring, S., McCracken, J., Diner, B.A., and Babcock, G.T. (1995) Spin-density distribution, conformation, and hydrogen bonding of the redox-active tyrosine Y_Z in photosystem II from multiple-electron magnetic-resonance spectroscopies: Implications for photosynthetic oxygen evolution, *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 10325–10335, doi: 10.1021/ja00146a017.
 41. Hays, A.M., Vassiliev, I.R., Golbeck, J.H., and Debus, R.J. (1998) Role of D1-His190 in proton-coupled electron transfer reactions in photosystem II: a chemical complementation study, *Biochemistry*, **37**, 11352–11365, doi: 10.1021/bi980510u.
 42. Berthomieu, C., Hienerwadel, R., Boussac, A., Breton, J., and Diner, B. (1998) Hydrogen bonding of redox-active tyrosine Z of photosystem II probed by FTIR difference spectroscopy, *Biochemistry*, **37**, 10547–10554, doi: 10.1021/bi980788m.
 43. Diner, B.A., Force, D.A., Randall, D.W., and Britt, R.D. (1998) Hydrogen bonding, solvent exchange, and coupled proton and electron transfer in the oxidation and reduction of redox-active tyrosine Y_Z in Mn-depleted core complexes of photosystem II, *Biochemistry*, **37**, 17931–17943, doi: 10.1021/bi981894r.
 44. Campell, K.A., Peloquin, J.M., Diner, B.A., Tang, X.S., Chisholm, D.A., and Britt, R.D. (1997) The τ-nitrogen of D2 histidine 189 is the hydrogen bond donor to the tyrosine radical Y_D[•] of photosystem II, *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 4787–4788, doi: 10.1021/ja9706155.

**ELECTRON TRANSFER ON THE DONOR SIDE
OF MANGANESE-DEPLETED PHOTOSYSTEM II****L. A. Vitukhnovskaya^{1,2}, E. V. Fedorenko³, and M. D. Mamedov^{1*}**¹ *Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119992 Moscow, Russia; E-mail: mahirmamedov@yandex.ru*² *Semenov Institute of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, 119334 Moscow, Russia*³ *Moscow Institute of Physics and Technology, 141701 Dolgoprudny, Moscow Region, Russia*

Received April 10, 2019

Revised June 5, 2019

Accepted June 5, 2019

After removal of the manganese ions, which are responsible for light-driven splitting of water, a redox-active tyrosine Y_Z (tyrosine-161 of the D1 subunit) is still the dominant electron donor to photooxidized chlorophyll P_{680} (P_{680}^+) in reaction center of photosystem 2 (PS2). P_{680}^+ reduction by tyrosine Y_Z under single-turnover flashes has been investigated in Mn-depleted PS2 core complexes (apo-PS2) in the presence of weak acids and NH_4Cl . Using kinetic analysis of light-induced absorption changes at 830 nm (reflecting P_{680} redox transitions) at pH 6.0, it was shown that P_{680}^+ reduction is well approximated by two kinetic components with characteristic times (τ) ~ 7 and 31 ms and relative contributions ~ 54 and $\sim 37\%$, respectively. In contrast to the slight effect of sodium formate (200 mM), addition of sodium acetate and NH_4Cl increased the rate of electron transfer between Y_Z and P_{680}^+ ~ 5 -fold. The assumption that direct electron transfer from Y_Z to P_{680}^+ has biphasic kinetics that probably reflects the presence of two different populations of PS2 centers is confirmed by data obtained using the direct electrometric technique on proteoliposomes with apo-PS2. It is demonstrated that the submillisecond two-phase kinetics of the additional electrogenic phase in the kinetics of the photoelectric response, due to electron transfer between Y_Z and P_{680}^+ , is significantly accelerated in the presence of acetate or ammonia. The obtained results are important for understanding the mechanism of interaction between exogenous compounds, including synthetic manganese-containing ones capable of photo-splitting of a water molecule, and oxidized tyrosine Y_Z in PS2 complexes lacking a manganese cluster.

Keywords: photosystem 2, reaction center, apo-PS2, absorption changes, photoelectric response, acetate, ammonia