БИОХИМИЯ, 2020, том 85, вып. 6, с. 817 – 830

УДК 577.125.3

ЭВОЛЮЦИОННАЯ УТРАТА СПОСОБНОСТИ ПЕРВИЧНОГО ДОНОРА ЭЛЕКТРОНА ФОТОСИСТЕМЫ 1 К РЕДОКС-ВЗАИМОДЕЙСТВИЮ С Mn-БИКАРБОНАТНЫМИ КОМПЛЕКСАМИ

© 2020 В.В. Терентьев*, С.К. Жармухамедов

Институт фундаментальных проблем биологии РАН ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН», 142290 Пущино Московской обл., Россия; электронная почта: v.v.terentyev@gmail.com

Поступила в редакцию 14.10.2019
После доработки 21.02.2020
Принята к публикации 03.04.2020

Структурно-функциональная организация донорной стороны реакционного центра (РЦ) фотосистемы 1 (ФС1) проявляет значительное сходство с РЦ пурпурных бактерий (бРЦ), хотя они относятся к разным типам. Более того, значения редокс-потенциалов их первичных доноров электрона идентичны и составляют ~0,5 В. Ранее в наших работах (Khorobrykh et al. (2008) *Pilos. Trans. R. Soc. B.*, **363**, 1245-1251; Terentyev et al. (2011) *Biochemistry* (*Moscow*), **76**, 1360-1366; Khorobrykh et al. (2018) *Chem. Bio. Chem.*, **14**, 1725-1731) была показана возможность редокс-взаимодействия «низкопотенциальных» Mn^{2+}-бикарбонатных комплексов с бРЦ, что, как предполагается, могло быть одним из начальных этапов эволюционного возникновения Mn-кластера водоокисляющего комплекса фотосистемы 2 в Архее (> 3 млрд лет назад). В данной работе исследовали редокс-взаимодействие между Mn^{2+}-бикарбонатными комплексами и ФС1. Было выявлено, что подобное взаимодействие практически отсутствует на исходных препаратах ФС1 и проявляется лишь на предварительно окисленных препаратах, содержащих ~50% окисленных РЦ. При этом редокс-взаимодействие между Mn^{2+}-бикарбонатными комплексами и ФС1 требовало повышенного содержания Mn^{2+}, а концентрационная зависимость от HCO_3^- указывала на участие электронейтрального «низкопотенциального» комплекса $[Mn(HCO_3)_2]$ в данном процессе. Анализ известной кристаллографической структуры ФС1 показал стерические затруднения на донорной стороне РЦ, которые могут препятствовать непосредственному редокс-взаимодействию между Mn^{2+}-бикарбонатными комплексами и окисленным первичным донором электрона. Сравнение структур РЦ ФС1 и более древнего РЦ из гелиобактерий, относящихся к одному типу РЦ, позволило предположить отсутствие у примитивной ФС1 в Архее подобных стерических затруднений на донорной стороне, а их эволюционное возникновение объяснить как следствие вовлечения РЦ ФС1 в функционирование в единой электрон-транспортной цепи фотосинтетической мембраны, что сопровождалось эволюционной утратой у ФС1 способности к редокс-взаимодействию с Mn^{2+}-бикарбонатными комплексами.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: фотосинтез, эволюция фотосинтеза, фотосистема 1, фотосинтетические реакционные центры, Mn-бикарбонатные комплексы.

DOI: 10.31857/S032097252006007X

Памяти Козлова Юрия Николаевича

ВВЕДЕНИЕ

Фотосинтез является одним из важнейших глобальных биохимических процессов, в результате которого за счет энергии солнечного излучения происходит ассимиляция CO_2, синтез органического вещества и, как следствие, накопление его в биосфере земли. Оксигенный (кислородный) фотосинтез является также источником практически всего молекулярного кислорода современной атмосферы.

Фотоиндуцированные реакции оксигенного фотосинтеза протекают в тилакоидных мембранах цианобактерий, зеленых водорослей и высших растений. В мембрану погружены крупные пигмент-белковые комплексы двух фотосис-

Принятые сокращения: ФС2 – фотосистема 2; ФС1 – фотосистема 1; ЭТЦ – электрон-транспортная цепь; РЦ – реакционный центр; бРЦ – бактериальный реакционный центр; гбРЦ – бактериальный реакционный центр из гелиобактерий; Хл – хлорофилл; бХЛ – бактериохлорофилл; Пц – пластоцианин; ДХФИФ – восстановленный 2,6-дихлорфенолиндофенол; БК – бикарбонат.

* Адресат для корреспонденции.

тем – фотосистемы 2 (ФС2) и фотосистемы 1 (ФС1), объединённые в единую электрон-транспортную цепь (ЭТЦ) [1–3]. Основу обеих фотосистем образуют гетеродимерные фотохимические реакционные центры (РЦ), в которых при участии кофакторов цепи переноса электрона происходят реакции фотоиндуцированного первичного разделения зарядов. В ФС2 этому сопутствует перенос электронов от молекул воды на акцепторы хиноновой природы, Q_A и Q_B, а в ФС1 – от небольших водорастворимых белков пластоцианина (Пц) или цитохрома c_6, восстановленных в результате транспорта электронов от ФС2, на Fe-S-кластеры и далее на ферредоксин [1–3].

Аноксигенный (бескислородный) фотосинтез, протекающий в фотосинтезирующих бактериях, является эволюционно более древним [4]. На впячиваниях цитоплазматической мембраны бактерий, в отличие от тилакоидной мембраны оксигенных организмов, функционирует лишь один РЦ (бРЦ), который, как считается, структурно-функционально гомологичен либо РЦ ФС2, либо РЦ ФС1 [4, 5]. Все известные РЦ, соответственно, относят либо к типу II, либо к типу I РЦ [4, 6]. Фотосинтетический аппарат бактерий также содержит пигмент бактериохлорофилл (бХл) вместо хлорофилла (Хл), который характерен для фотосистем тилакоидной мембраны [6]. Стоит отметить, что бРЦ типа II (пурпурные и зеленые нитчатые бактерии) являются гетеродимерными белковыми комплексами, так же, как и РЦ ФС2 и ФС1. В то же время бРЦ типа I (зеленые серные, гелиобактерии и ацидобактерии) имеют гомодимерную структуру [2, 6, 7], что может указывать на более раннее ответвление бРЦ типа I от общего эволюционного пути развития фотосинтетических РЦ.

Разделение всех РЦ на два типа, описанное выше, в основном зависит от химической природы их конечных акцепторов электрона. Так, РЦ типа II содержат акцепторы электрона хиноновой природы, а РЦ типа I в качестве акцепторов электрона содержат Fe-S-кластеры [5–8]. Подобное разделение полностью игнорирует структурно-функциональные различия и сходства РЦ на их донорных сторонах. Согласно им, как описано ниже, бРЦ типа II и РЦ ФС1 (тип I РЦ) очень похожи и значительно отличаются от РЦ ФС2 (тип II РЦ). Так, значения редокс-потенциала (E_m) первичных доноров электрона в РЦ пурпурных бактерий, P_{870}, и РЦ ФС1, P_{700}, составляют ~0,5 В [3, 9, 10]. Вторичными донорами электрона для бРЦ типа II и РЦ ФС1 служат небольшие водорастворимые белки, соответственно цитохром c_2 и цитохром c_6 или Пц, обладающие близкими значениями E_m [6, 8]. Также бРЦ типа II и РЦ ФС1 характеризуются сравнимыми расстояниями между вторичными и первичными донорами электрона, и значениями диэлектрической проницаемости этого участка [11]. В отличие от бРЦ типа II и РЦ ФС1, E_m первичного донора электрона в РЦ ФС2, P_{680}, гораздо выше и может достигать значения 1,12–1,20 В [12, 13], что делает его одним из наиболее сильных окислителей в природе. Вторичным донором электрона в РЦ ФС2 является редокс-активный тирозин Y_z белка D1, восстанавливающийся от Mn-кластера [3, 6, 8], а значение диэлектрической проницаемости участка между Mn-кластером, Y_z и P_{680} в РЦ ФС2 значительно ниже по сравнению с таковым между вторичным и первичным донором электрона в бРЦ типа II и РЦ ФС1 [11].

Наиболее вероятно, что отличия в структурно-функциональной организации донорной стороны РЦ ФС2 от бРЦ типа II и РЦ ФС1 были вызваны возникновением у его непосредственного эволюционного предшественника (наиболее вероятно, что это были бРЦ типа II) способности к использованию молекул воды в качестве донора электронов. Для протекания подобной реакции требуется накопление четырех окислительных эквивалентов, необходимых для одновременного окисления двух молекул воды, а также, чтобы первичный донор электрона РЦ обладал достаточно высоким значением E_m.

В ФС2 современных организмов сопряжение четырехэлектронного окисления двух молекул воды с одноэлектронным фотоиндуцированным переносом электрона в РЦ осуществляется благодаря уникальному Mn-содержащему кластеру (Mn_4CaO_5) [14], расположенному на донорной стороне.

Несмотря на основополагающее значение Mn-кластера для оксигенного фотосинтеза, вопрос о его эволюционном возникновении не решен до сих пор. Mn-кластер отсутствует у бРЦ типа II, которые эволюционно наиболее близки к РЦ ФС2. Также не обнаружено ни «переходных», ни содержащих «примитивный» Mn-кластер фотосинтезирующих организмов.

Мы предполагаем, что в эволюционном возникновении Mn-кластера в Архее (более 2,5 млрд лет назад) ключевую роль могли сыграть Mn^{2+}-бикарбонатные комплексы [15–19]. Одни из них, $[Mn(HCO_3)_2]$, согласно данным электрохимии, являются электронейтральными и характеризуются по сравнению с аква-катионом Mn^{2+} довольно низким потенциалом окисления Mn^{2+}, равным ~0,52 В [20–23]. Это значение довольно близко к E_m первичного донора электрона в РЦ пурпурных бактерий [9] и, как было показано [16–18], бРЦ типа II действительно способны использовать такие комплексы в качестве доноров

электрона. Основываясь на данных геохимии, в Архее концентрация CO_2 была высокой [15], Mn^{2+}-бикарбонатные комплексы могли быть достаточно широко представлены и, соответственно, использоваться бРЦ типа II в качестве доноров электронов. Впоследствии в результате эволюционных изменений в структуре РЦ на донорной стороне мог возникнуть специальный сайт связывания Mn^{2+}-бикарбонатных комплексов, способствующий более эффективному редокс-взаимодействию этих комплексов с первичным донором электрона. Это, в свою очередь, могло стать предпосылкой для формирования примитивного тетра-марганец-бикарбонатного кластера.

В отличие от донорной стороны РЦ ФС2, донорная сторона РЦ ФС1 не подвергалась подобным масштабным эволюционным изменениям, и ее структурно-функциональная организация до сих пор проявляет сходство с донорной стороной бРЦ типа II [11]. Более того, значение E_m первичных доноров электрона обоих РЦ практически идентичны (~0,5 В) [3, 9, 10]. Исходя из этого, можно ожидать, что редокс-взаимодействие между Mn^{2+}-бикарбонатными комплексами и бРЦ типа II, показанное нами ранее [16–18], возможно и в случае с РЦ ФС1. Это могло бы свидетельствовать о сходной направленности в эволюционной приспосабливаемости фотосинтезирующих организмов к условиям высокого содержания бикарбоната (БК) в окружающей среде Архея (до 200 мМ [15]) и, как следствие, к использованию широко представленных Mn^{2+}-бикарбонатных комплексов в качестве доноров электронов разными типами РЦ.

В данной работе исследовали редокс-взаимодействие между Mn^{2+}-бикарбонатными комплексами и первичным донором электрона РЦ ФС1, P_{700}. Полученные результаты свидетельствуют о возможности подобного взаимодействия, но только на предварительно окисленных препаратах ФС1. Это может рассматриваться как подтверждение предположения о возможном использовании Mn^{2+}-бикарбонатных комплексов в Архее непосредственно перед возникновением оксигенного фотосинтеза в качестве доноров электрона примитивными РЦ ФС2 (бРЦ) и ФС1 и дальнейшей потерей этой способности у РЦ ФС1 в результате адаптации ее структурной организации для функционирования в единой фотосинтетической ЭТЦ оксигенной тилакоидной мембраны.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для получения фотохимически активных фрагментов тилакоидных мембран, обогащенных ФС1 (далее ФС1), использовали 2–3-недельные листья гороха (*Pisum sativum*). Из суспензии солюбилизированных в присутствии Triton X-100 тилакоидных мембран с помощью центрифугирования осаждали кислород-выделяющие фрагменты мембран, обогащенные ФС2 [24]. Используемое соотношение Triton X-100 к Хл составляло 20:1. Легкие фрагменты, обогащенные ФС1, оставшиеся в супернатанте, осаждали ультрацентрифугированием: сначала при 80 000 g, 30 мин (осадок отбрасывали), затем при 180 000 g, 3 ч. Осадок, содержащий ФС1, ресуспендировали в среде, содержащей 25 мМ MES-NaOH, pH 6,5, 15 мМ NaCl, 5 мМ $MgCl_2$ и 300 мМ сахарозы до концентрации по Хл 1,5–2 мг/мл. Препараты хранили в присутствии 10%-ного глицерина при –70 °С. Все этапы работы по изолированию ФС1 проводили при 4 °С и слабом освещении зеленым светом.

Общую концентрацию Хл в препаратах ФС1 определяли спектрофотометрически после экстракции пигментов 80 %-ным ацетоном [25].

Кинетику фотоиндуцированных изменений поглощения, связанных с обратимым фотоокислением P_{700}, измеряли в 10 мм кювете при комнатной температуре на фосфороскопической установке, позволяющей разделять действующий и измерительный свет [16]. Интенсивность действующего света ($660 < \lambda < 800$ нм) составляла ~1000 мкмолей фотонов $м^{-2}$ $с^{-1}$.

Измерения проводили в среде, содержащей 50 мМ Hepes (pH 8,3) и обедненной по CO_2/HCO_3^-. Удаление CO_2/HCO_3^- достигали благодаря продуванию среды воздухом без CO_2, для чего его пропускали через 20 см слой аскарита и 50 %-ный раствор NaOH [26].

Визуализация взаимного расположения P_{700} и аминокислотных остатков в ФС1 была выполнена с помощью программы VMD (Иллинойский университет, США) [27] с использованием данных о кристаллической структуре ФС1 из высших растений (2WSE [28]), взятых с сайта PBD (https://www.rcsb.org).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Пигмент-белковые комплексы ФС2 и ФС1 у современных организмов строго разделены в тилакоидной мембране: ФС2 преимущественно находится в стэкированных мембранах гран, в то время как ФС1 локализуется в мембранах ламелл и поверхностных (нестэкированных) мембранах гран [1, 3]. Это позволяет легко получать мембранные препараты, обогащенные либо ФС2, либо ФС1. Спектральные характеристики обеих фотосистем в подобных препаратах

хорошо известны и служат надежным способом как для проверки степени чистоты той или другой фотосистемы, так и их фотоиндуцированной активности.

Дифференциальный спектр поглощения «свет минус темнота» выделенных нами препаратов ФС1 из гороха представлен на рис. 1. По своим спектральным характеристикам он полностью соответствует опубликованным ранее данным для высших растений [29–31]. Известно [31], что полосы выцветания при 700 нм и 430 нм отражают фотоиндуцированное образование и накопление P^+_{700}, а максимум при 682 нм и, соответственно, минимум при 689 нм являются электрохромным сдвигом полосы поглощения Хл при 680 нм, вызванным электростатическим полем образовавшегося P^+_{700}. Таким образом, амплитуда изменения поглощения в области 700 нм (ΔA_{700}) при освещении препаратов ФС1 действующим светом отражает непосредственное фотонакопление P^+_{700}, а темновая релаксация, соответственно, восстановление до P_{700}.

Как показано на рис. 2 в препаратах ФС1 в ответ на включение действующего света наблюдалось быстрое (неразрешаемое) нарастание ΔA_{700} до максимального значения (ΔA^{MAX}_{700}), которое не изменялось со временем. На величину ΔA^{MAX}_{700} практически не оказывали влияния известные доноры электронов – аскорбат Na или восстановленный 2,6-дихлорфенолиндофенол (ДХФИФ). Это свидетельствовало о том, что изначально препараты не содержали окисленных

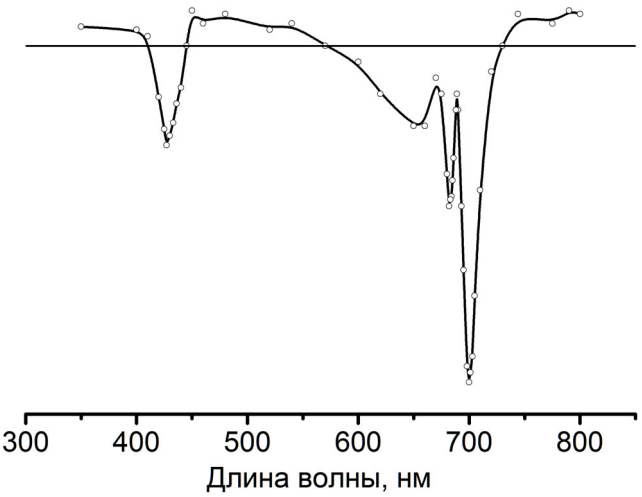

Рис. 1. Дифференциальный спектр поглощения «свет минус темнота» препаратов ФС1, выделенных из листьев гороха. Измерения проводили в присутствии 0,2 мМ аскорбата Na и 0,1 мМ 2,6-дихлорфенолиндофенола (режим фотонакопления P^+_{700}). Содержание хлорофилла 10 мкг/мл. Действующий свет $660 < \lambda < 800$ нм, 1000 мкмолей фотонов $м^{-2}$ $с^{-1}$

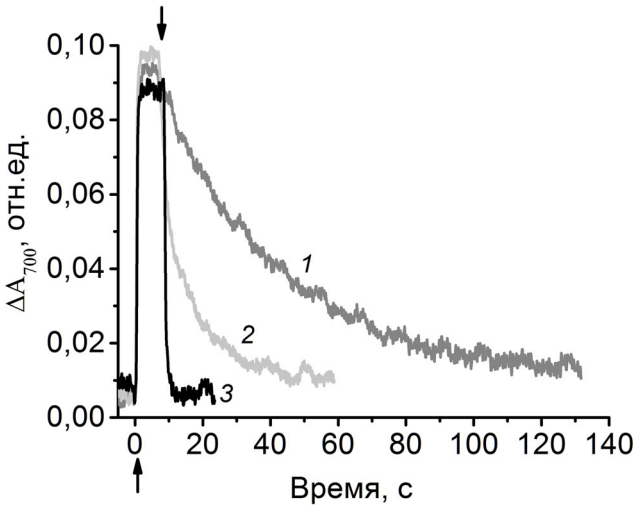

Рис. 2. Кинетика фотоиндуцированных изменений поглощения при 700 нм, связанных с фотоокислением и последующим темновым восстановлением первичного донора электрона, P_{700}, в препаратах ФС1. Кривые: *1* – в отсутствии добавок (контроль), *2* – в присутствии 1 мМ аскорбата Na, *3* – в присутствии 1 мМ аскорбата Na и 0,1 мМ 2,6-дихлорфенолиндофенола. Стрелками (↑↓) обозначены, соответственно, включение и выключение действующего света. Условия измерений см. в подписи к рис. 1. Для удобства представления шкала поглощения здесь и далее дана в обратных значениях

первичных доноров электрона, и при включении действующего света в окисленное состояние переходило 100% P_{700}. То есть ΔA^{MAX}_{700} эквивалентно переходу всех первичных доноров электрона в окисленное состояние.

Тем не менее доноры электрона значительно ускоряли кинетику темнового восстановления P^+_{700} (рис. 2). В отсутствие добавок практически полное темновое восстановление P^+_{700} происходило ~ за 150 с (τ ~ 35 с) и значительно ускорялось в присутствии доноров электронов – аскорбата Na (τ ~ 7 с) или ДХФИФ.

Известно, что значение E_m первичного донора электрона в РЦ ФС1 составляет ~0,5 В [3, 10], что эквивалентно E_m первичного донора электрона в РЦ пурпурных бактерий [9]. Как было показано в предыдущих работах [16–18], РЦ из пурпурных бактерий в отсутствие на донорной стороне цитохромной С-субъединицы способны к редокс-взаимодействию с Mn^{2+}, но только в присутствии ионов БК (HCO_3^-), т.е., когда Mn^{2+} находится в составе Mn^{2+}-бикарбонатных комплексов. Причем согласно ЭПР-данным, полученным при криогенных температурах (5К), бРЦ под действием света окисляют Mn^{2+} в присутствии БК до Mn^{3+} [18].

Ранее экспериментально было установлено, что значение E_m первичного донора электрона РЦ является одним из условий осуществления

подобного редокс-взаимодействия, которое полностью исчезало в случае бРЦ типа II изолированных из зеленой нитчатой бактерии *Chloroflexus aurantiacus*, характеризующихся более низким значением E_m первичного донора электрона по сравнению с РЦ пурпурных бактерий [17]. Другими необходимыми условиями редокс-взаимодействия между Mn^{2+}-бикарбонатными комплексами и первичным донором электрона бРЦ являются значение pH среды и концентрация растворенного в ней БК. Так, стимулирование восстановления P^+_{870} в бРЦ в присутствии Mn^{2+} и HCO^-_3 наблюдалось только при pH ~ 8,3 и концентрации БК > 30 мМ [16, 17]. Как было позднее показано с помощью электрохимии, формирование и доминирование в растворе «низкопотенциальных» (по сравнению с аква-катионом Mn^{2+}) комплексов $[Mn(HCO_3)_2]$ с потенциалом окисления Mn^{2+}, равным 0,52 В, помимо высокой концентрации ионов HCO^-_3 [21–23], также требуется pH ~ 8,3 [32]. Исходя из полных констант устойчивости для разных типов Mn^{2+}-бикарбонатных комплексов [22, 23], было рассчитано распределение Mn^{2+} между ними в растворе при pH 8,3 в зависимости от концентрации ионов HCO^-_3 [19], которое показало, что при 30 мМ БК только ~25% Mn^{2+} находится в комплексе $[Mn(HCO_3)_2]$, а при 50 мМ БК на долю этого комплекса приходится уже более 40%.

РЦ ФС1, помимо «подходящего» для редокс-взаимодействия с «низкопотенциальными» Mn^{2+}-бикарбонатными комплексами значения E_m первичного донора электрона, также характеризуются оптимумом своей фотосинтетической активности в области pH 8,5–9,0 [33, 34], что совпадает с указанным выше необходимым значением pH для формирования комплексов $[Mn(HCO_3)_2]$. С одной стороны, это может служить косвенным указанием на то, что эволюционный предшественник современной ФС1 мог функционировать при значениях pH благоприятных для формирования в среде комплексов $[Mn(HCO_3)_2]$. С другой стороны, интересно отметить, что pH оптимум фотосинтетической активности ФС2, с которой ФС1 параллельно функционирует в тилакоидной мембране, находится в более кислой области 6,2–6,5 [26], а pH люмена тилакоидов современных оксигенных фотосинтезирующих организмов колеблется в диапазоне от 7,0 до 6,0 (возможно до 5,5) (см. подробнее в [26]). Тем не менее в результате серии проведенных нами экспериментов на препаратах ФС1 было обнаружено, что при pH 8,3 присутствие 0,5 мМ Mn^{2+} вместе с 50 мМ HCO^-_3 (т.е. в условиях формирования и доминирования в среде «низкопотенциальных» Mn^{2+}-бикарбонатных комплексов, способных к редокс-взаимодействию с P^+_{870} в бРЦ) не оказывает влияния ни на величину ΔA_{700}, ни на кинетику темнового восстановления P^+_{700} (рис. 3), что свидетельствовало об отсутствии редокс-взаимодействия между комплексами $[Mn(HCO_3)_2]$ и P^+_{700}.

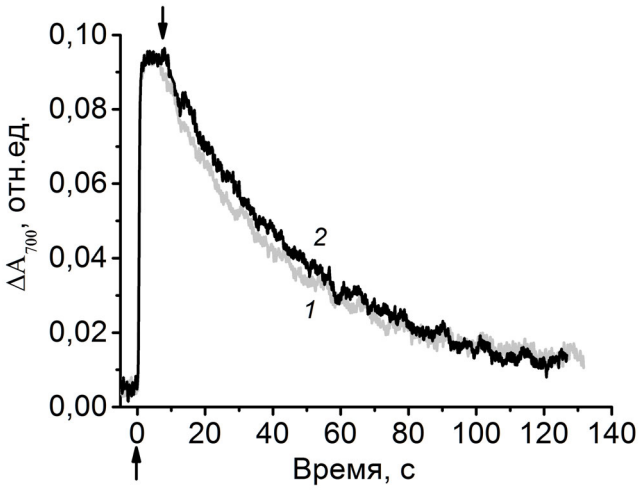

Рис. 3. Фотоокисление P_{700} и его темновое восстановление. Кривые: *1* – в отсутствие добавок (контроль), *2* – в присутствии 0,5 мМ $MnCl_2$ и 50 мМ $NaHCO_3$. Стрелками (↑↓) обозначены соответственно включение и выключение действующего света. Условия измерений см. в подписи к рис. 1

Кристаллографические структуры РЦ из пурпурных бактерий и ФС1 (https://www.rcsb.org) характеризуются схожим расстоянием между первичным донором электрона и поверхностью донорной стороны. Кроме того, оба РЦ имеют близкие значения диэлектрической проницаемости этого участка, а перенос электрона от вторичного к первичному донору электрона на протеолипосомах, содержащих РЦ из пурпурных бактерий или ФС1, сопровождается генерацией сравнимой разности электрических потенциалов $\Delta\psi$ (~20% от трансмембранного значения $\Delta\psi$) [11, 35]. Исходя из вышесказанного, наиболее логичным объяснением наблюдаемого отсутствия редокс-взаимодействия между Mn^{2+}-бикарбонатными комплексами и P^+_{700} могло быть наличие некого стерического затруднения для осуществления переноса электрона на донорной стороне РЦ ФС1 от Mn^{2+} (в составе бикарбонатного комплекса) на P^+_{700}.

В ходе изучения данного предположения мы искусственно переводили P_{700} в препаратах ФС1 в «долгоживущее» окисленное состояние. Для этого адаптированные к темноте ФС1 инкубировали в присутствии 1 мМ $K_3[Fe(CN)_6]$ в течение 1 мин с последующим переосаждением препаратов в исходном буфере, не содержащем $K_3[Fe(CN)_6]$. В результате такой обработки у

~40–45% ФС1 первичный донор электрона находился в «долгоживущем» окисленном состоянии («окисленные» ФС1), о чем свидетельствовало снижение величины ΔA_{700} на 40–45% (рис. 4, кинетика *1*) по сравнению с таковой, наблюдаемой в присутствии экзогенных доноров электрона (0,1 мМ аскорбата Na и 0,1 мМ ДХФИФ), способных к быстрому и полному восстановлению P_{700}^{+} в темноте (рис. 4, кинетика *4*). Учитывая, что ΔA_{700} в присутствии доноров электрона соответствует ΔA_{700}^{MAX} (рис. 2), детектируемые 55–60% от ΔA_{700}^{MAX}, соответственно, отражали количество РЦ с восстановленными P_{700}, способными к фотоокислению, от общего количества РЦ. Темновая инкубация «окисленных» ФС1 в течение 20–30 мин не изменяла долю ΔA_{700} относительно ΔA_{700}^{MAX}, что свидетельствовало об отсутствии спонтанного темнового восстановления P_{700}^{+} в условиях эксперимента.

При добавлении к таким «окисленным» ФС1 0,5 мМ Mn^{2+} вместе с 50 мМ HCO_3^- нам удалось обнаружить возрастание амплитуды ΔA_{700} до, примерно, 80% от ΔA_{700}^{MAX} (рис. 4, кинетика *2*). Это свидетельствовало о том, что в ходе эксперимента количество восстановленных в темноте

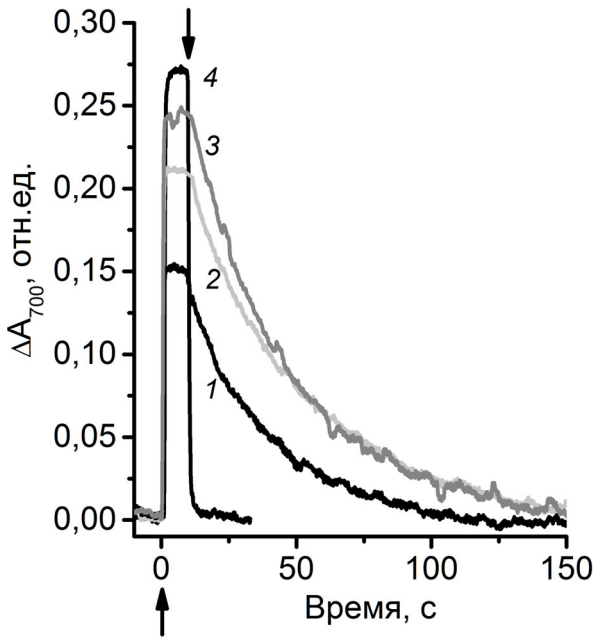

Рис. 4. Кинетики фотоиндуцированных изменений поглощения при 700 нм препаратов «окисленных» ФС1 (прединкубированных с $K_3[Fe(CN)_6]$). Кривые: *1* – в отсутствие добавок, в присутствии 0,5 мМ $MnCl_2$ и 50 мМ $NaHCO_3$: инкубирование перед измерением 3 мин (*2*) и 10 мин (*3*); *4* – в присутствии 0,1 мМ аскорбата Na и 0,1 мМ 2,6-дихлорфенолиндофенола. Концентрация препаратов по хлорофиллу 30 мкг/мл. Действующий свет $660 < \lambda < 800$ нм, 1000 мкмолей фотонов $м^{-2}$ $с^{-1}$. Стрелками (↑↓) обозначены, соответственно, включение и выключение действующего света.

P_{700} в препаратах «окисленных» ФС1 возрастало на 20–25%. Более того, было выявлено, что последующее дополнительное темновое инкубирование «окисленных» ФС1 в присутствии Mn^{2+}-бикарбонатных комплексов приводит к увеличению доли восстановленных P_{700} в препаратах. Через 10 мин темновой инкубации удавалось достичь максимального эффекта, так что ΔA_{700} составляла ~90% от ΔA_{700}^{MAX} (рис. 4, кинетика *3*). Тем не менее, в проведенных экспериментах не было обнаружено очевидного влияния присутствия 0,5 мМ Mn^{2+} вместе с 50 мМ HCO_3^- на кинетику темнового восстановления P_{700}^{+} в отличие от того, как это наблюдалось в присутствии аскорбата Na или ДХФИФ (рис. 4, кинетика *4*). Важно отметить, что наблюдаемый эффект показывал специфичность по отношению к Mn^{2+}-бикарбонатным комплексам. Как следует из рис. 5, добавление к «окисленным» ФС1 0,5 мМ Mn^{2+} или 50 мМ HCO_3^- отдельно друг от друга не оказывало влияния ни на ΔA_{700}, ни на кинетику темнового восстановления P_{700}^{+} даже после инкубации в темноте в течение 10 мин (рис. 5, *а*). Также эффект отсутствовал при добавлении других двухвалентных катионов металлов (Mg^{2+} и Ca^{2+}) в присутствии 50 мМ HCO_3^- (рис. 5, *б*, кинетики *3* и *4*) или ионов ацетата и формиата в присутствии 0,5 мМ Mn^{2+} после 10 мин инкубации в темноте (рис. 5, *б*, кинетики *5* и *6*).

Как было сказано выше, одним из необходимых условий для доминирования «низкопотенциальных» комплексов $[Mn(HCO_3)_2]$ среди других комплексов в растворе является повышенная концентрация БК [21–23]. В то же время, как было показано с помощью ЭПР-спектроскопии, от концентрации катионов Mn^{2+} зависит лишь количество этих комплексов, но не их тип [22]. В предыдущих работах на бРЦ мы наблюдали зависимость эффективности редокс-взаимодействия Mn^{2+}-бикарбонатных комплексов с P_{870}^{+} от концентраций HCO_3^- и Mn^{2+} [16]. Так, в присутствии 0,5 мМ Mn^{2+} и при добавлении БК до 10–15 мМ не наблюдалось ускорения темнового восстановления P_{870}^{+}, которое начинало проявляться при увеличении концентрации БК до 30 мМ и достигало максимального эффекта при 50 мМ БК [16]. В то же время в присутствии 50 мМ HCO_3^- ускорение темнового восстановления P_{870}^{+} наблюдалось уже при 0,01 мМ Mn^{2+} и достигало максимума при 0,5 мМ Mn^{2+} [16], что, по-видимому, отражало насыщение раствора комплексами $[Mn(HCO_3)_2]$, способными к редокс-взаимодействию с P_{870}^{+} в бРЦ.

На рис. 6, *а* показано влияние увеличивающейся концентрации Mn^{2+} на ΔA_{700} в «окисленных» ФС1 в присутствии 50 мМ HCO_3^-. Явное увеличение ΔA_{700}, по сравнению с исходным

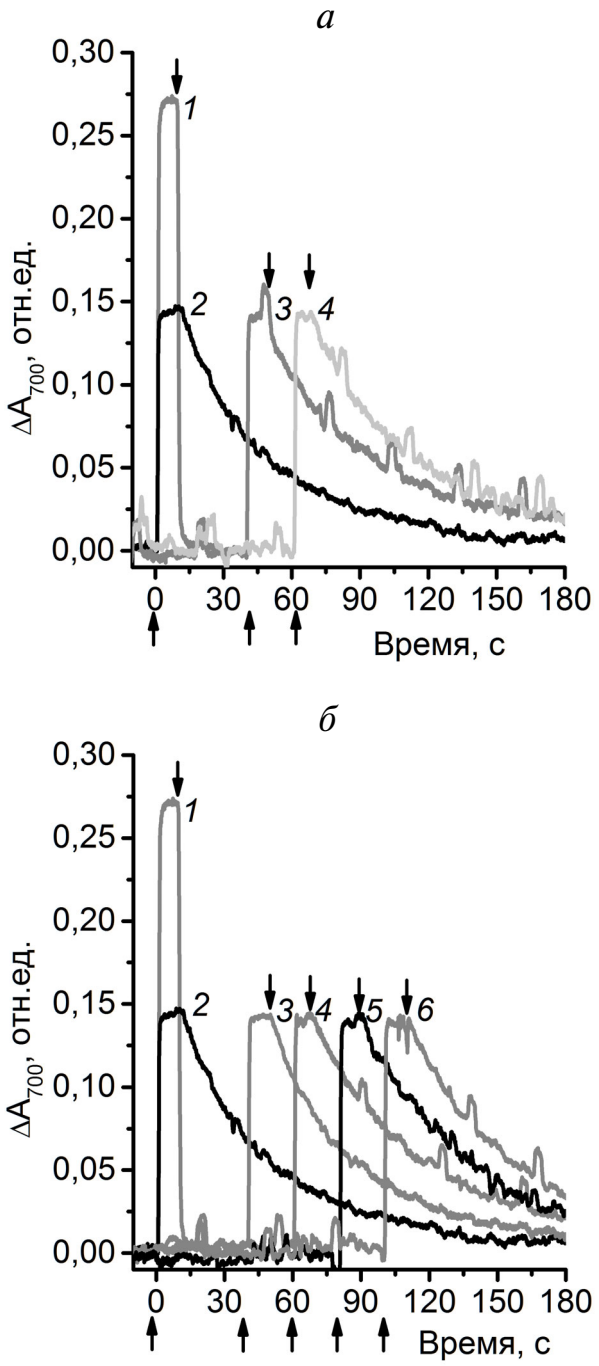

Рис. 5. Кинетики фотоиндуцированных изменений поглощения при 700 нм препаратов «окисленных» ФС1 (прединкубированных с $K_3[Fe(CN)_6]$). *а*) Кривые: *1* – в присутствии 0,1 мМ аскорбата Na и 0,1 мМ 2,6-дихлорфенолиндофенола; *2* – в отсутствие добавок; *3* – в присутствии 0,5 мМ $MnCl_2$; *4* – в присутствии 50 мМ $NaHCO_3$; *б*) кривые: *1* – в присутствии 0,1 мМ аскорбата Na и 0,1 мМ 2,6-дихлорфенолиндофенола; *2* – в отсутствие добавок; *3* – в присутствии 0,5 мМ $MgCl_2$ и 50 мМ $NaHCO_3$; *4* – в присутствии 0,5 мМ $CaCl_2$ и 50 мМ $NaHCO_3$; *5* – 0,5 мМ $MnCl_2$ и 50 мМ формиата; *6* – 0,5 мМ $MnCl_2$ и 50 мМ ацетата. Стрелками (↑↓) обозначены, соответственно, включение и выключение действующего света. Условия измерений см. в подписи к рис. 4

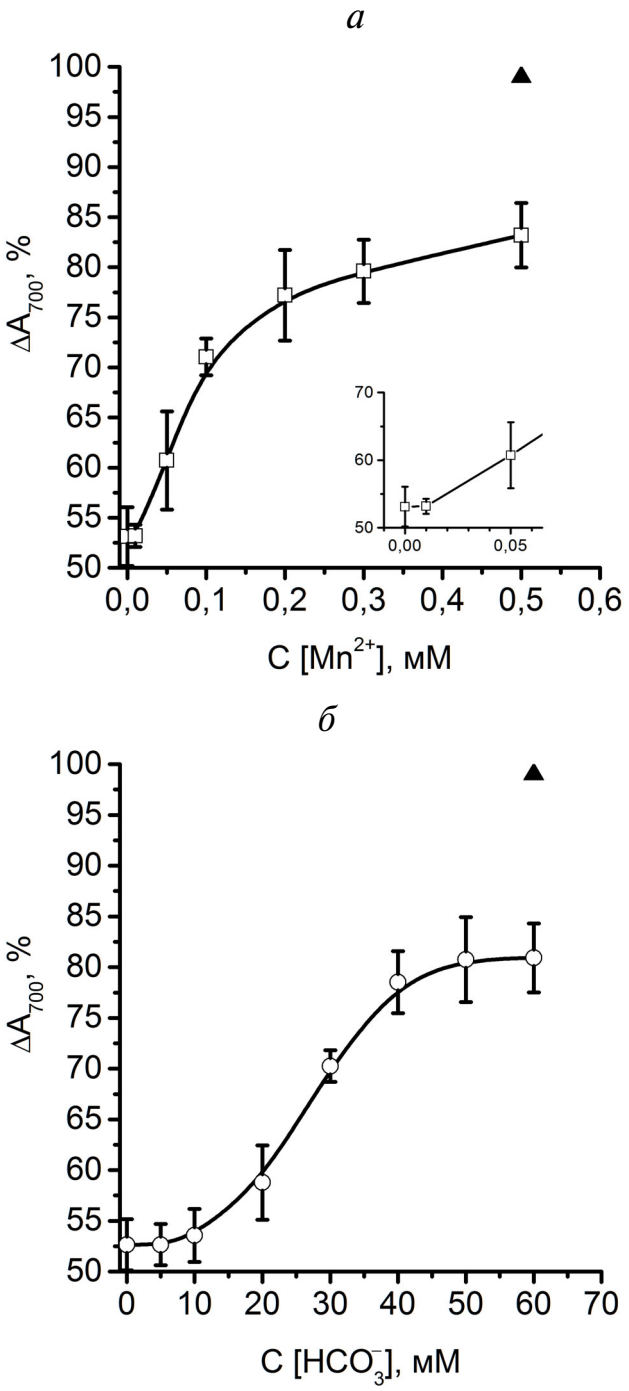

Рис. 6. Зависимость стимулирующего эффекта Mn^{2+}-бикарбонатных комплексов на амплитуду ΔA_{700} в «окисленных» ФС1 от концентрации Mn^{2+} (*а*) или HCO_3^- (*б*). Измерения проводили соответственно в присутствии 50 мМ $NaHCO_3$ или 0,5 мМ $MnCl_2$. Черным треугольником обозначено максимальное значение ΔA_{700} в присутствии 1 мМ аскорбата Na и 0,1 мМ 2,6-дихлорфенолиндофенола (ΔA_{700}^{MAX}). На врезке показан тот же график, что и (*а*), но в области концентраций Mn^{2+} от 0 до 50 мкМ.

значением в «окисленных» ФС1, наблюдалось при 0,05 мМ Mn^{2+} и достигало максимума при 0,2–0,3 мМ Mn^{2+}. В то же время в присутствии 0,5 мМ Mn^{2+} влияние HCO_3^- на ΔA_{700} в «окисленных» ФС1 начинало явно проявляться при концентрациях выше 20 мМ, достигая максимума при 40 мМ HCO_3^- (рис. 6, *б*). Полученные результаты хорошо коррелируют с зависимостью доминирования в растворе комплексов $[Mn(HCO_3)_2]$ от концентрации БК. Кроме того, они практически совпали с данными, полученными нами ранее на бРЦ [16].

Интересно отметить, что зависимость эффекта от концентрации Mn^{2+} отличалась от полученной нами ранее на бРЦ [16]. В случае с ФС1 эффект полностью отсутствовал при 0,01 мМ Mn^{2+} (в отличие от бРЦ), начиная проявляться только при 0,05 мМ Mn^{2+} (рис. 6, *а*). Учитывая, что Mn^{2+} влияет на концентрацию содержащихся в среде комплексов $[Mn(HCO_3)_2]$, можно предположить, что для инициирования редокс-взаимодействия Mn^{2+}-бикарбонатных комплексов с P_{700}^+ требуется более высокое содержание в растворе комплексов $[Mn(HCO_3)_2]$, чем в случае с бРЦ, даже на предварительно окисленных препаратах ФС1.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В предыдущих работах мы впервые экспериментально показали способность бРЦ типа II к редокс-взаимодействию с Mn^{2+} в присутствии БК [16–18]. Учитывая, что бРЦ типа II считаются наиболее вероятными эволюционными предшественниками РЦ ФС2, полученные в тех работах результаты рассматривались как подтверждение гипотезы о возможном участии Mn^{2+}-бикарбонатных комплексов в эволюционном возникновении Mn-кластера водоокисляющего комплекса ФС2 в Архее (> 2,5 млрд лет назад) [15–18].

Учитывая сходство структурно-функциональных характеристик донорных сторон [11] и значений редокс-потенциалов первичных доноров электрона в бРЦ типа II и ФС1 [3, 9, 10] (см. Введение), было предположено, что редокс-взаимодействие между комплексами $[Mn(HCO_3)_2]$ и первичным донором электрона должно быть характерно и для РЦ ФС1. Однако, как показали проведенные нами эксперименты, присутствие «низкопотенциальных» Mn^{2+}-бикарбонатных комплексов не оказывало влияния ни на фотоокисление P_{700}, ни на его восстановление в темноте (рис. 3).

Одной из наиболее вероятных причин подобного результата могло быть стерическое затруднение на донорной стороне ФС1, препятствующее возможному редокс-взаимодействию Mn^{2+}-бикарбонатных комплексов с P_{700}^+. Действительно, как следует из кристаллографических структур ФС1, изолированных из цианобактерий, зеленых водорослей и высших растений, их РЦ имеют консервативный гидрофобный мотив на донорной стороне, расположенный прямо перед P_{700}. Он сформирован аминокислотными остатками двух триптофанов, принадлежащих параллельным люменальным петлям разных субъединиц РЦ (соответственно PsaA-Trp_{655}/Trp_{651} и PsaB-Trp_{631}/Trp_{627} в цианобактериях/водорослях и высших растениях) (рис. 7, *а*). Считается, что эти триптофаны образуют своеобразный сэндвич с объединенной электронной системой в непосредственной близости от P_{700} [36, 37]. Согласно современным представлениям, такая структура играет важную роль в корректном докинге молекул цитохрома c_6 и Пц для быстрого донирования электрона на первичный донор электрона [36–38]. Дополнительно белковая поверхность около P_{700} окружена отрицательно заряженными (PsaA-Asp_{648} и PsaB-Asp_{624}) и положительно заряженными (PsaA-Arg_{647} и PsaB-Arg_{623}) аминокислотными остатками, играющими роль в правильном ориентировании гема в цитохроме c_6 или меди в Пц относительно гидрофобного сэндвича и P_{700}^+ [36, 37]. Более того, вокруг триптофанового сэндвича легко прослеживается своеобразное кольцо, сформированное гидрофобными аминокислотами, которое вместе с ним практически полностью отделяет P_{700} от люмена (рис. 7, *б* и *в*). В настоящее время в литературе отсутствуют данные о каком-либо функциональном значении данного гидрофобного кольца на донорной стороне ФС1.

Подобное окружение P_{700} может сильно затруднять редокс-взаимодействие Mn^{2+}-бикарбонатных комплексов с P_{700}^+. Гидратная оболочка Mn^{2+} в комплексах с БК сохраняет 5 или 4 молекул воды в зависимости от типа комплекса (из 6 возможных в аква-катионе Mn^{2+}) [20, 21]. Соответственно, гидрофобный сэндвич из двух триптофанов, находящийся непосредственно перед P_{700}, совместно с гидрофобным кольцом не позволяют комплексам подходить достаточно близко к P_{700} для осуществления прямого редокс-взаимодействия. Как показано на рис. 7, *а* расстояние между внешним кольцом триптофана, обращенным в люмен, и ближайшим к нему циклом в молекуле Хл в P_{700} составляет ~9,6–9,7 Å, а расстояние до центра молекулы Хл составляет уже 13,6–13,8 Å. При этом, для Mn^{2+}-бикарбонатных комплексов эти значения могут быть еще больше вследствие гидрофобного воз-

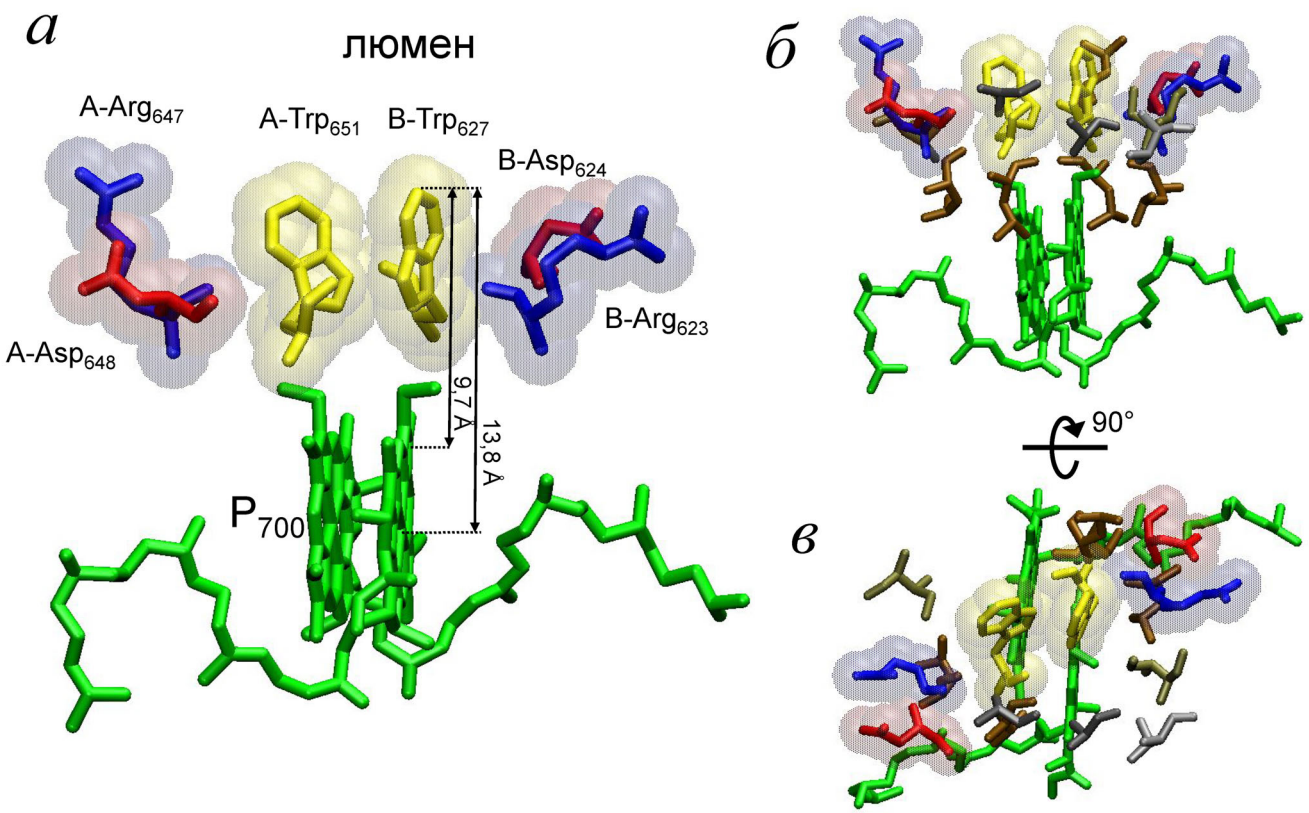

Рис. 7. Взаимное расположение P_{700} и гидрофобных и заряженных аминокислот в его окружении. Гидрофобный сэндвич перед P_{700} (зелёный цвет), образованный парой A-Trp_{651}/B-Trp_{627} (желтый цвет), отрицательно заряженные A-Asp_{648} и B-Asp_{624} (красный цвет) и положительно заряженные A-Arg_{647} и B-Arg_{623} (синий цвет), участвующие в корректном докинге цитохрома c_6 или Пц. A- и B-, соответственно, субъединицы PsaA и PsaB в РЦ ФС1. *а* – Стрелками указаны расстояния между внешним кольцом Trp и ближайшим к нему кольцом и центром молекулы хлорофилла P_{700}; *б* – указано гидрофобное кольцо, образованное A-$Ala_{654/652}$ (темно-серый цвет), A-Val_{657} (серый цвет), A-Ile_{658} и B-Ile_{634} (темно-желтый), A-$Leu_{646/650}$ и B-$Leu_{628/626/622}$ (коричневый); вид со стороны тилакоидной мембраны; *в* – то же самое, что *б*, но вид со стороны люмена. (С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/)

действия сэндвича (рис. 7, *а*). Заряженные аминокислотные остатки, в свою очередь, могут оказывать влияние на электрохимические свойства Mn^{2+} в комплексе с БК. Согласно имеющимся данным [20–23], «низкопотенциальные» Mn^{2+}-бикарбонатные комплексы формируются с участием двух ионов HCO_3^-, которые, помимо снижения потенциала окисления Mn^{2+} до ~0,52 В, также нейтрализуют и общий заряд комплекса $[Mn(HCO_3)_2]$. Отрицательно заряженные PsaA-Asp_{648} и PsaB-Asp_{624}, находящиеся вблизи P_{700}, могут притягивать к себе Mn^{2+} в комплексах, одновременно выталкивая HCO_3^- из их оболочки. При этом удаление даже одного из двух ионов HCO_3^-, т.е. изменение стехиометрии комплекса $[Mn(HCO_3)_2] \rightarrow [Mn(HCO_3)]^+$ (как показано ранее [20, 21, 23]) приводит к повышению потенциала окисления Mn^{2+} до ~0,61 В, делая термодинамически затруднительным его редокс-взаимодействие с P_{700}^+ (E_m ~ 0,5 В). Удаление обоих ионов HCO_3^- повышает потенциал окисления Mn^{2+} уже до ~0,67 В [20, 21, 23]. Положительно заряженные PsaA-Arg_{647} и PsaB-Arg_{623}, наоборот, могут оттягивать на себя ионы HCO_3^- из комплексов, отталкивая положительно заряженные $[Mn(HCO_3)]^+$ или даже Mn^{2+}, также повышая потенциал окисления Mn^{2+} по описанному выше принципу. Учитывая, что аминокислотные остатки в разнозаряженных парах PsaA-Asp_{648}/Arg_{647} и PsaB-Asp_{624}/Arg_{623} находятся параллельно друг другу на довольно близком расстоянии, соответственно ~4,0 и ~3,3 Å (рис. 7, *в*), можно предположить их совместное влияние на электрохимические свойства Mn^{2+} в комплексе с БК. В результате это может значительно затруднять редокс-взаимодействие Mn^{2+} с P_{700}^+ даже в присутствии высоких концентраций БК.

Тем не менее редокс-взаимодействие Mn^{2+}-бикарбонатных комплексов с P_{700}^+ возможно, хотя и сильно затруднено. Для этого первичный донор электрона было необходимо перевести в

окисленное состояние и инкубировать в присутствии Mn^{2+} и БК несколько минут (рис. 4). Но даже в этом случае, по сравнению с экспериментами на бРЦ типа II [16–18], требовалось в 5 раз больше Mn^{2+} (т.е. Mn^{2+}-бикарбонатных комплексов) для наблюдения эффекта (рис. 6, *а*). Зависимость эффекта от присутствия Mn^{2+} и HCO_3^- (рис. 5), а также от высокой концентрации БК (рис. 6, *б*), указывали на участие именно «низкопотенциальных» комплексов $[Mn(HCO_3)_2]$ в редокс-взаимодействии с окисленным первичным донором электрона ФС1.

Недавно полученный кристалл бРЦ типа I из гелиобактерии (гбРЦ) [39] позволяет провести сравнительный анализ структурной организации между РЦ ФС1 и его наиболее возможного эволюционного предшественника (бРЦ типа I). Интересно, что, как указывают сами авторы работы, несмотря на то, что в структуре гбРЦ, так же, как и в РЦ ФС1, на донорной стороне присутствуют поверхностные параллельные спирали двух белков РЦ, в гбРЦ они короче и не несут гидрофобных триптофанов. Более того, поверхность гбРЦ около первичного донора в основном содержит нейтральные и гидрофильные аминокислотные остатки [39], хотя вторичным донором электрона выступает цитохром c_{553}, который имеет очень схожую структуру с цитохромом c_6 [39].

Таким образом, можно предположить, что эволюционный предшественник РЦ ФС1 (бРЦ типа I) или даже РЦ примитивной ФС1 могли не иметь описанных выше стерических затруднений на донорной стороне и его РЦ был доступен для редокс-взаимодействия с Mn^{2+}-бикарбонатными комплексами, подобно бРЦ типа II.

Согласно данным геохимии, содержание CO_2 в древней бескислородной атмосфере Архея (> 3 млрд лет назад) было гораздо выше современного уровня [40, 41], вследствие чего концентрация растворенного в воде БК могла достигать 200 мМ [15]. Очевидно, что это благоприятствовало нахождению большей части растворенного Mn^{2+} в виде «низкопотенциальных» Mn^{2+}-бикарбонатных комплексов [20, 21, 23], которые, вероятно, могли использоваться в качестве доноров электронов РЦ обоих типов.

В подтверждение предположения о широко распространенной в Архее Mn^{2+}-фототрофии у фотосинтезирующих организмов можно рассматривать данные, полученные при изучении осадочных пород в глубоких скважинах Южной Африки [42]. Согласно им, в слоях карбонатов, относящихся ко времени >2,4 млрд лет назад, детектируется аномально высокое содержание Mn (до 16,6% по весу). Вторичное диагенетическое формирование подобных карбонатов хорошо известно [43] и, согласно предположению авторов, могло произойти в результате восстановления оксидов Mn (IV) углеродом органического происхождения (уравнения 1 и 2) [42].

$$2\,MnO_2 + CH_2O + 2\,H^+ \longrightarrow 2\,Mn^{2+} + CO_3^{2-} + 2\,H_2O, \quad (1)$$

$$Mn^{2+} + CO_3^{2-} \longrightarrow MnCO_3. \quad (2)$$

Однако при этом утверждается, что в аноксигенном Архее окисление Mn^{2+} с последующим образованием его оксидов в концентрациях, необходимых для формирования обнаруженных пород, было невозможно в отсутствие сильного окислителя [42]. Если принять во внимание выдвигаемую нами гипотезу окисления Mn^{2+} фотосинтетическими РЦ, то масштабное образование и накопление MnO_2 в осадочных породах можно было бы объяснить следующими процессами (ур. 3–7):

$$Mn^{2+} - e \xrightarrow{\text{бРЦ и ФС1}} Mn^{3+}, \quad (3)$$

$$Mn^{3+} + 3H_2O \longrightarrow Mn(OH)_3 + 3\,H^+, \quad (4)$$

$$Mn(OH)_3 - H_2O \longrightarrow Mn^{3+}OOH \text{ или } (O{=}Mn^{3+}{-}OH), \quad (5)$$

$$\begin{matrix} O{=}Mn^{3+}{-}OH \\ O{=}Mn^{3+}{-}OH \end{matrix} - H_2O \begin{matrix} \nearrow O{=}Mn^{3+}{-}O{-}Mn^{3+}{=}O \text{ или } (Mn_2O_3)^{а} \\ \text{или} \\ \searrow Mn^{2+}\langle{}^{O}_{O}\rangle Mn^{4+}{=}O \text{ или } (Mn_2O_3)^{б} \end{matrix}, \quad (6)$$

$$Mn_2O_3^{а} + Mn_2O_3^{б} \xrightarrow{\text{диспропорционирование}} Mn^{2+} + 3\,O{=}Mn^{4+}{=}O \text{ или } (MnO_2). \quad (7)$$

Интересно, что авторы вышеуказанной работы тоже приходят к выводу об отсутствии абиотических механизмов в Архее, которые могли бы привести к окислению Mn^{2+} при формировании изучаемых пород. Более того, они поддерживают идею широкого присутствия Mn-окисляющих фотосинтезирующих организмов в окружающей среде Архея непосредственно перед возникновением и распространением оксигенных организмов.

Перед возникновением единой ЭТЦ оба типа РЦ должны были локализоваться в одной мембране, но при этом функционировать независимо друг от друга. Вернее всего, тип II РЦ был представлен бРЦ, которые уже обладали специальным сайтом связывания Mn^{2+}-бикарбонатных комплексов или даже содержали на донорной стороне примитивный тетра-марганец-бикарбонатный кластер (пред-ФС2). В то же время тип I РЦ, по-видимому, был представлен примитивной ФС1. Проводя аналогию со схемой электронного транспорта в РЦ пурпурных бактерий (бРЦ типа II) и зеленых серных

бактерий (бРЦ типа I) [4], можно предположить, что, соответственно, пред-ФС2 имела циклический транспорт электронов с участием цитохромного bc_1-комплекса, пронизывающего мембрану, и небольшого растворимого белка – цитохрома c_2, а примитивная ФС1 могла осуществлять как циклический транспорт электронов посредством цитохромного bc_1-комплекса и цитохрома *c*, так и линейный транспорт – от донора электрона на ферредоксин и далее на НАДФ$^+$. В случае линейного транспорта электронов примитивная ФС1 так же, как и бРЦ типа II в аноксигенных бактериях, могла активно использовать Mn^{2+}-бикарбонатные комплексы в качестве доноров электрона. Интересно, что переключение между циклическим и нециклическим транспортом электронов характерно также для ФС1 современных организмов. Однако неизвестно, является ли это сохраненным и адаптированным свойством бРЦ типа I, которые были эволюционными предшественниками ФС1, или это все же заново приобретенный механизм. В пред-ФС2 часть электронов циклического транспорта могла акцептироваться другими молекулами, выпадая из цикла, что восполнялось электронами от Mn^{2+}-бикарбонатных комплексов.

Предполагается, что молекулярный кислород начал накапливаться в атмосфере Земли ~2,5 млрд лет назад [6]. Однако резкая интенсификация формирования слоистых железных формаций (руд) (движущей силой мог быть фотосинтетический O_2) произошла гораздо раньше, ~3,1 млрд лет назад [6]. Следовательно, к этому времени уже должно было произойти объединение ФС2 и ФС1 в единую ЭТЦ и завершиться формирование Mn-кластера на донорной стороне ФС2, окисляющего воду и продуцирующего O_2 в окружающую среду. Примерно к этому же времени в атмосфере Земли произошло резкое снижение концентрации CO_2 [40, 41], поэтому ~3 млрд лет назад уровень CO_2 практически достиг современного значения. Это должно было сопровождаться значительным снижением в окружающей среде «низкопотенциальных» Mn^{2+}-бикарбонатных комплексов, способных к редокс-взаимодействию с РЦ, однако требующих высокого содержания HCO_3^- [15–19].

Эволюционное возникновение у пред-ФС2 Mn-кластера, и, соответственно, появление способности к окислению воды (т.е. эволюционное возникновение ФС2 и оксигенного фотосинтеза) привело к снижению роли циклического транспорта электронов у этого РЦ. В то же время снижение доступности доноров электронов в виде Mn^{2+}-бикарбонатных комплексов, наоборот, могло привести к вовлечению примитивной ФС1 в акцептирование электронов от участников циклического транспорта электронов пред-ФС2 (т.е. трансмембранного цитохромного bc_1-комплекса и мобильного белка цитохрома *c*), находящихся в той же самой фотосинтетической мембране. Появление и последующее эволюционное закрепление единой ЭТЦ с участием обеих фотосистем, которая характерна для всех современных оксигенных фотосинтезирующих организмов, способствовали максимальному переключению ФС2 на использование воды в качестве донора электронов и, соответственно, к повышению продуцирования O_2.

Присутствие все большего количества O_2 в фотосинтетической мембране оказывало негативное влияние на активность ФС1, поскольку вероятность образования активных форм кислорода около ее РЦ в результате взаимодействия O_2 с кофакторами цепи переноса электронов довольно высокая [44]. Как предполагается, это могло привести к структурным изменениям в архитектуре РЦ ФС1, направленных на снижение вероятности образования активных форм кислорода. В частности, это привело к потере мобильности хиноновых акцепторов и погружению их в белковый матрикс [45], а также к изменению взаимного расположения кофакторов цепи переноса электронов [39, 45], что вполне могло повлиять и на окружение P_{700} и, как следствие, на механизм его редокс-взаимодействия со вторичными донорами электрона. Более того, в результате дальнейшего совершенствования водоокисляющего комплекса, в частности, вовлечения Ca в структуру Mn-кластера, появления дополнительных белковых субъединиц (внешние белки ФС2), вовлечения антенных субъединиц в лигандирование Mn-кластера [14], возрастал поток электронов от ФС2 в ЭТЦ, что могло способствовать адаптации донорной стороны ФС1 к максимально эффективному редокс-взаимодействию со вторичным донором электрона, цитохромом c_6. В результате могло произойти эволюционное появление и закрепление гидрофобного сэндвича из двух триптофанов перед P_{700} и заряженных аминокислот в окружении P_{700} (см. выше) [36, 37], обеспечивающих правильную ориентацию гема в молекуле цитохрома c_6 относительно P_{700} и высокую скорость переноса электрона на P_{700}. Однако одновременно с этим подобные адаптации донорной стороны ФС1 практически полностью заблокировали возможность эффективного редокс-взаимодействия между P_{700}^+ и «низкопотенциальными» Mn^{2+}-бикарбонатными комплексами, несмотря

на то, что термодинамически подобное взаимодействие возможно.

Финансирование. Работа выполнена в рамках Госзадания (АААА-А17-117030110136-8).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. В данной работе отсутствуют исследования, в которых использовали в качестве объектов людей или животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nelson, N., and Yocum, C. F. (2006) Structure and function of photosystems I and II, *Annu. Rev. Plant Biol.*, **57**, 521-565, doi: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105350.
2. Nelson, N. (2013) Evolution of photosystem I and the control of global enthalpy in an oxidizing world, *Photosynth. Res.*, **116**, 145-151, doi: 10.1007/s11120-013-9902-6.
3. Caffarri, S., Tibiletti, T., Jennings, R., and Santabarbara, S. (2014) A comparison between plant photosystem I and photosystem II architecture and functioning, *Curr. Protein Pept. Sci.*, **15**, 296-331, doi: 10.2174/1389203715666140327102218.
4. Blankenship, R. E. (2010) Early evolution of photosynthesis, *Plant Physiol.*, **154**, 434-438, doi: 10.1104/pp.110.161687.
5. Allen, J. P., and Williams, J. C. (1998) Photosynthetic reaction centers, *FEBS Lett.*, **438**, 5-9, doi: 10.1016/S0014-5793(98)01245-9.
6. Hohmann-Marriott, M. F., and Blankenship, R. E. (2011) Evolution of photosynthesis, *Annu. Rev. Plant Biol.*, **62**, 515-548, doi: 10.1146/annurev-arplant-042110-103811.
7. Heathcote, P., Jones, M. R., and Fyfe, P. K. (2003) Type I photosynthetic reaction centres: structure and function, *Philos. Trans. R. Soc. London. Ser. B Biol. Sci.*, **358**, 231-243, doi: 10.1098/rstb.2002.1178.
8. Blankenship, R. E. (1992) Origin and early evolution of photosynthesis, *Photosynth. Res.*, **33**, 91-111, doi: 10.1007/BF00039173.
9. Lin, X., Murchison, H. A., Nagarajan, V., Parson, W. W., Allen, J. P., and Williams, J. C. (1994) Specific alteration of the oxidation potential of the electron donor in reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **91**, 10265-10269, doi: 10.1073/pnas.91.22.10265.
10. Brettel, K., and Leibl, W. (2001) Electron transfer in photosystem I, *Biochim. Biophys. Acta*, **1507**, 100-114, doi: 10.1016/S0005-2728(01)00202-X.
11. Semenov, A. Y., Kurashov, V. N., and Mamedov, M. D. (2011) Transmembrane charge transfer in photosynthetic reaction centers: some similarities and distinctions, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, **104**, 326-332, doi: 10.1016/j.jphotobiol.2011.02.004.
12. Rappaport, F., Guergova-Kuras, M., Nixon, P. J., Diner, B. A., and Lavergne, J. (2002) Kinetics and pathways of charge recombination in photosystem II, *Biochemistry*, **41**, 8518-8527, doi: 10.1021/bi025725p.
13. Allakhverdiev, S. I., Tomo, T., Shimada, Y., Kindo, H., Nagao, R., Klimov, V. V., and Mimuro, M. (2010) Redox potential of pheophytin a in photosystem II of two cyanobacteria having the different special pair chlorophylls, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **107**, 3924-3929, doi: 10.1073/pnas.0913460107.
14. 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.
15. Dismukes, G. C., Klimov, V. V., Baranov, S. V., Kozlov, Y. N., DasGupta, J., and Tyryshkin, A. (2001) The origin of atmospheric oxygen on Earth: the innovation of oxygenic photosynthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **98**, 2170-2175, doi: 10.1073/pnas.061514798.
16. Khorobrykh, A. A., Terentyev, V. V., Zharmukhamedov, S. K., and Klimov, V. V. (2008) Redox interaction of Mn-bicarbonate complexes with reaction centres of purple bacteria, *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, **363**, 1245-1251, doi: 10.1098/rstb.2007.2221.
17. Terentyev, V. V., Shkuropatov, A. Y., Shkuropatova, V. A., Shuvalov, V. A., and Klimov, V. V. (2011) Investigation of the redox interaction between Mn-bicarbonate complexes and reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides* R-26, *Chromatium minutissimum*, and *Chloroflexus aurantiacus*, *Biochemistry (Moscow)*, **76**, 1360-1366, doi: 10.1134/S0006297911120091.
18. Khorobrykh, A., Dasgupta, J., Kolling, D. R. J., Terentyev, V., Klimov, V. V., and Dismukes, G. C. (2013) Evolutionary origins of the photosynthetic water oxidation cluster: bicarbonate permits Mn^{2+} photo-oxidation by anoxygenic bacterial reaction centers, *Chembiochem*, **14**, 1725-1731, doi: 10.1002/cbic.201300355.
19. Terentyev, V. V., Khorobrykh, A. A., and Klimov, V. V. (2015) Photooxidation of Mn-bicarbonate complexes by reaction centers of purple bacteria as a possible stage in the evolutionary origin of the water-oxidizing complex of photosystem II, in: *Photosynthesis: New Approaches to the Molecular, Cellular, and Organismal Levels* (Allakhverdiev, S. I., ed.) Scrivener Publishing LLC, pp. 85-132, doi: 10.1002/9781119084150.ch2.
20. Kozlov, Y. N., and Kazakova, A. A. (1997) Changes in the redox potential and catalase activity of Mn^{2+} ions during formation of Mn-bicarbonate complexes, *Membr. Cell Biol.*, **11**, 115-120.
21. Kozlov, Y. N., Zharmukhamedov, S. K., Tikhonov, K. G., Dasgupta, J., Kazakova, A. A., Dismukes, G. C., and Klimov, V. V. (2004) Oxidation potentials and electron donation to photosystem II of manganese complexes containing bicarbonate and carboxylate ligands, *Phys.*

Chem. Chem. Phys., **6**, 4905-4911, doi: 10.1039/b406569g.

22. Dasgupta, J., Tyryshkin, A. M., Kozlov, Y. N., Klimov, V. V., and Dismukes, G. C. (2006) Carbonate complexation of Mn^{2+} in the aqueous phase: redox behavior and ligand binding modes by electrochemistry and EPR spectroscopy, *J. Phys. Chem. B*, **110**, 5099-5111, doi: 10.1021/jp055213v.
23. Tikhonov, K. G., Zastrizhnaya, O. M., Kozlov, Y. N., and Klimov, V. V. (2006) Composition and catalase-like activity of Mn(II)-bicarbonate complexes, *Biochemistry (Moscow)*, **71**, 1270-1277, doi: 10.1134/S0006297906110137.
24. Ford, R. C., and Evans, M. C. W. (1983) Isolation of a photosystem II preparation from higher plants with highly enriched oxygen evolution activity, *FEBS Lett.*, **160**, 159-164, doi: 10.1016/0014-5793(83)80957-0.
25. Porra, R. J., Thompson, W. A., and Kriedemann, P. E. (1989) Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy, *Biochim. Biophys. Acta*, **975**, 384-394, doi: 10.1016/S0005-2728(89)80347-0.
26. Terentyev, V. V., Shukshina, A. K., and Shitov, A. V. (2019) Carbonic anhydrase CAH3 supports the activity of photosystem II under increased pH, *Biochim. Biophys. Acta*, **1860**, 582-590, doi: 10.1016/j.bbabio.2019.06.003.
27. Humphrey, W., Dalke, A., and Schulten, K. (1996) VMD: Visual molecular dynamics, *J. Mol. Graph.*, **14**, 33-38, doi: 10.1016/0263-7855(96)00018-5.
28. Amunts, A., Toporik, H., Borovikova, A., and Nelson, N. (2010) Structure determination and improved model of plant photosystem I, *J. Biol. Chem.*, **285**, 3478-3486, doi: 10.1074/jbc. M109.072645.
29. Melis, A. (1989) Spectroscopic methods in photosynthesis: photosystem stoichiometry and chlorophyll antenna size, *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, **323**, 397-409, doi: 10.1098/rstb. 1989.0019.
30. Hu, Q., Miyashita, H., Iwasaki, I., Kurano, N., Miyachi, S., Iwaki, M., and Itoh, S. (1998) A photosystem I reaction center driven by chlorophyll d in oxygenic photosynthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **95**, 13319-13323, doi: 10.1073/pnas.95.22.13319.
31. Shuvalov, V. A. (1976) The study of the primary photoprocesses in photosystem I of chloroplasts recombination luminescence, chlorophyll triplet state and triplet–triplet annihilation, *Biochim. Biophys. Acta*, **430**, 113-121, doi: 10.1016/0005-2728(76)90227-9.
32. Kozlov, Y. N., Tikhonov, K. G., Zastrizhnaya, O. M., and Klimov, V. V. (2010) pH-Dependence of the composition and stability of MnIII–bicarbonate complexes and its implication for redox interaction of MnII with photosystemII, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, **101**, 362-366, doi: 10.1016/j.jphotobiol.2010.08.009.
33. Yang, X., Zhang, Y. H., Yang, Z. L., Chen, L. J., He, J. L., and Wang, R. F. (2009) pH dependence of photosynthetic behavior of plant photosystem I particles, *Russ. J. Plant Physiol.*, **56**, 599-606, doi: 10.1134/S1021443709050033.
34. Petrova, A., Mamedov, M., Ivanov, B., Semenov, A., and Kozuleva, M. (2018) Effect of artificial redox mediators on the photoinduced oxygen reduction by photosystem I complexes, *Photosynth. Res.*, **137**, 421-429, doi: 10.1007/s11120-018-0514-z.
35. 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.
36. Sommer, F., Drepper, F., Haehnel, W., and Hippler, M. (2004) The hydrophobic recognition site formed by residues PsaA-Trp 651 and PsaB-Trp 627 of photosystem I in chlamydomonas reinhardtii confers distinct selectivity for binding of blastocyanin and cytochrome *c*6, *J. Biol. Chem.*, **279**, 20009-20017, doi: 10.1074/jbc.M313986200.
37. Busch, A., and Hippler, M. (2011) The structure and function of eukaryotic photosystem I, *Biochim. Biophys. Act*a, **1807**, 864-877, doi: 10.1016/j. bbabio. 2010.09.009.
38. Hippler, M., Drepper, F., Farah, J., and Rochaix, J.-D. (1997) Fast electron transfer from cytochrome *c* 6 and plastocyanin to photosystem I of *Chlamydomonas reinhardtii* requires PsaF, *Biochemistry*, **36**, 6343-6349, doi: 10.1021/bi970082c.
39. Gisriel, C., Sarrou, I., Ferlez, B., Golbeck, J. H., Redding, K. E., and Fromme, R. (2017) Structure of a symmetric photosynthetic reaction center–photosystem, *Science*, **357**, 1021-1025, doi: 10.1126/science.aan5611.
40. Nunn, J. F. (1998) Evolution of the atmosphere, *Proc. Geol. Assoc.*, **109**, 1-13, doi: 10.1016/S0016-7878(98)80001-1.
41. Royer, D. L. (2006) CO2-forced climate thresholds during the Phanerozoic, *Geochim. Cosmochim. Acta*, **70**, 5665-5675, doi: 10.1016/j.gca.2005.11.031.
42. Johnson, J. E., Webb, S. M., Thomas, K., Ono, S., Kirschvink, J. L., and Fischer, W. W. (2013) Manganese-oxidizing photosynthesis before the rise of cyanobacteria, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **110**, 11238-11243, doi: 10.1073/pnas.1305530110.
43. Okita, P. M., Maynard, J. B., Spiker, E. C., and Force, E. R. (1988) Isotopic evidence for organic matter oxidation by manganese reduction in the formation of stratiform manganese carbonate ore, *Geochim. Cosmochim. Acta*, **52**, 2679-2685, doi: 10.1016/0016-7037(88)90036-1.
44. Kozuleva, M. A., and Ivanov, B. N. (2016) The mechanisms of oxygen reduction in the terminal reducing segment of the chloroplast photosynthetic electron transport chain, *Plant Cell Physiol.*, **57**, 1397-1404, doi: 10.1093/pcp/pcw035.
45. Orf, G. S., Gisriel, C., and Redding, K. E. (2018) Evolution of photosynthetic reaction centers: insights from the structure of the heliobacterial reaction center, *Photosynth. Res.*, **138**, 11-37, doi: 10.1007/s11120-018-0503-2.

EVOLUTIONARY LOSS OF THE ABILITY OF THE PHOTOSYSTEM I PRIMARY ELECTRON DONOR FOR THE REDOX INTERACTION WITH Mn-BICARBONATE COMPLEXES

V. V. Terentyev* and S. K. Zharmukhamedov

Institute of Basic Biological Problems, Pushchino Scientific Center for Biological Research, Russian Academy of Sciences, 142290 Pushchino, Moscow Region, Russia; E-mail: v.v.terentyev@gmail.com

Received October 14, 2019
Revised February 21, 2020
Accepted April 3, 2020

The structure and functional organization of the photosystem I (PSI) reaction center (RC) donor side has a significant similarity to the reaction centers of purple bacteria (bRCs), despite the fact that they belong to different types of RCs. Moreover, the redox potential values of their primary electron donors are identical (~0.5 V). In our earlier reports [Khorobrykh et al. (2008) *Phylos. Trans. R. Soc. B.*, **363**, 1245-1251; Terentyev et al. (2011) *Biochemistry* (*Moscow*), **76**, 1360-1366; Khorobrykh et al. (2018) *ChemBioChem*, **14**, 1725-1731], we have demonstrated redox interaction of low-potential Mn^{2+}-bicarbonate complexes with bRCs, which might have been one of the first steps in the evolutionary origin of Mn-cluster of the photosystem II water-oxidizing complex that occurred in the Archean (over 3 billion years ago). In this study, we investigated redox interactions between Mn^{2+}-bicarbonate complexes and PSI. Such interactions were almost absent in the original PSI preparations and emerged only in preoxidized PSI preparations containing ~50% oxidized RCs. The interaction between Mn^{2+}-bicarbonate complexes and PSI required increased Mn^{2+} concentrations, while its dependence on the HCO_3^- concentration indicated involvement of electroneutral low-potential $[Mn(HCO_3)_2]$ complex in the process. Analysis of the PSI crystal structure revealed steric hindrances on the RC donor side, which could block the redox interaction between Mn^{2+}-bicarbonate complexes and oxidized primary electron donor. Comparison of structures of RCs from the PSI and ancient RCs from heliobacteria belonging to the same type of RCs suggested that such hindrances should be absent in the primitive PSI in the Archean and allowed to explain their evolutionary origin as a consequence of PSI RCs into the united electron transport chain (ETC) of the photosynthetic membrane that was accompanied by the evolutionary loss of PSI capacity for the redox interaction with Mn^{2+}-bicarbonate complexes.

Keywords: photosynthesis, evolution of photosynthesis, photosystem I, photosynthetic reaction centers, Mn-bicarbonate complexes