

УДК 577.23

ГЕНЕРАЦИЯ ФОТОЭЛЕКТРИЧЕСКИХ ОТВЕТОВ ЯДЕРНЫМИ КОМПЛЕКСАМИ ФОТОСИСТЕМЫ 2 В ПРИСУТСТВИИ ЭКЗОГЕННОГО ЦИТОХРОМА *c*

© 2021 Л.А. Витухновская^{1,2}, Р.А. Симонян¹, А.Ю. Семенов^{1,2}, М.Д. Мамедов^{1*}

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

² Институт химической физики РАН имени Н.Н. Семенова, 119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 10.08.2021

После доработки 20.09.2021

Принята к публикации 20.09.2021

Влияние экзогенного цитохрома *c* (цит *c*) на кинетику фотоэлектрических ответов ($\Delta\Psi$) в двух типах ядерных комплексов фотосистемы 2 (ФС2) (нативные, ФС2 с активным комплексом окисления воды, и Mn-лишенные), реконструированных в липосомы, было исследовано прямым электрометрическим методом. Комплексы ФС2 были локализованы в мембранах протеолипосом донорной стороной наружу. В присутствии окисленного цит *c* (цит c^{3+}), локализованного во внутреннем пространстве протеолипосом, содержащих нативные комплексы ФС2, исследовалась кинетика образования $\Delta\Psi$ в ответ на лазерную вспышку света. Помимо быстрого основного (< 0,3 мкс) электрогенного компонента, обусловленного переносом электрона от редокс-активного тирозина Y_Z к первичному хинонному акцептору Q_A , появлялась дополнительная электрогенная компонента. Эта компонента с характеристическим временем $\tau \approx 40$ мкс и относительной амплитудой $\sim 10\%$ от суммарной $\Delta\Psi$ была приписана векторному переносу электрона от Q_A^- к цит c^{3+} , выступающему в качестве экзогенного акцептора электрона. При добавлении восстановленного цит *c* (цит c^{2+}) к суспензии протеолипосом, содержащих Mn-лишенные ядерные комплексы ФС2, в кинетике образования $\Delta\Psi$ также появлялась дополнительная электрогенная компонента с $\tau \approx 70$ мкс и относительной амплитудой $\sim 20\%$ от суммарной $\Delta\Psi$. Данная компонента была приписана электрогенному переносу электрона от цит c^{2+} на фотоокисленный тирозин Y_Z . Полученные данные свидетельствуют о том, что цит c^{3+} может служить весьма эффективным экзогенным акцептором электрона для Q_A^- в случае нативного ФС2, а цит c^{2+} – эффективным искусственным донором электронов для Y_Z в ФС2, лишенной Mn-кластера. Полученные данные о роли цит c^{2+} и цит c^{3+} в качестве донора и акцептора электронов для ФС2 соответственно могут быть использованы при создании гибридных фотоэлектрохимических систем преобразования солнечной энергии на основе фотосинтетических пигмент-белковых комплексов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: фотосистема 2, протеолипосомы, фотоэлектрический ответ, перенос электрона, цитохром *c*.

DOI: 10.31857/S0320972521110014

ВВЕДЕНИЕ

Фотосистема 2 (ФС2) представляет собой димерный пигмент-белковый комплекс, расположенный в тилакоидных мембранах цианобактерий и хлоропластов, который функционирует как H_2O -пластохинон оксидоредуктаза [1–4]. У цианобактерий и растений каждый из мономеров ФС2 содержит 20 и 27 индивидуальных белковых субъединиц соответственно [5–8]. Две

основные интегральные субъединицы, D1 и D2, которые являются наиболее консервативными среди всех кислород-выделяющих фотосинтезирующих организмов, с пятью трансмембранными спиралями каждая, образуют реакционный центр (РЦ) комплекса ФС2, несущий большинство редокс-кофакторов. Этими кофакторами являются: первичный донор электронов – P_{680} , специальная пара молекул хлорофилла (Хл) *a* – P_{D1} и P_{D2} , два дополнительных Хл – Chl_{D1} и Chl_{D2} , два феофитина, два пластохинона, негемовое железо, а также две молекулы тирозина. Комплекс окисления воды (КОВ), состоящий из неорганического кластера Mn_4CaO_5 и окружающей белковой матрицы [5–10], расположен на люменальной стороне тилакоидной мембраны. Гидрофильные внешние субъединицы, так-

Принятые сокращения: КОВ – комплекс окисления воды; РЦ – реакционный центр; ФС2 – фотосистема 2; Хл – хлорофилл; цит *c* – цитохром *c*; ЭДТА – этилендиаминтетраацетат; HEPES – 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазин-этансульфоновая кислота; $\Delta\Psi$ – трансмембранная разность электрических потенциалов.

* Адресат для корреспонденции.

же расположенные на донорной стороне РЦ, взаимодействуют с белками D1/D2 и стабилизируют кластер Mn_4CaO_5 .

В ядерном комплексе ФС2 вспышка света, поглощаемого непосредственно пигментами РЦ или светособирающей антенной (субъединицы 43 и 47 кДа), вызывает разделение зарядов между P_{680} и первичным хинонным акцептором (Q_A). Фотоокисленный P_{680} восстанавливается редокс-активным тирозином Y_Z (Tyr161 субъединицы PsbA), а нейтральный радикал Y_Z , в свою очередь, окисляет марганцевый кластер. Далее происходит восстановление терминального хинонного акцептора Q_B в результате переноса электрона от Q_A^- . Последующие световые вспышки приводят к дальнейшему окислению марганцевого (Mn) кластера КОВ. В процессе переноса четырех электронов от двух молекул H_2O на фотоокисленный P_{680}^+ редокс-состояние (S) КОВ последовательно претерпевает переходы от S_0 до S_4 , где цифры 0–4 отражают величину положительного заряда, накапливающегося в КОВ. Таким образом, в комплексе ФС2 происходит сопряжение реакции одноэлектронного переноса между Y_Z и Q_A с двухэлектронным/двухпротонным восстановлением Q_B и четырехэлектронным/четырёхпротонным процессом окисления воды [1, 11–18].

Взаимодействие экзогенных окислительно-восстановительных медиаторов с фотосинтетическими пигмент-белковыми комплексами и электродами, которые в конечном счете аккумулируют восстановительные эквиваленты, образующиеся при освещении, особенно широко изучается в последние два десятилетия [19–22]. Одним из актуальных подходов, позволяющих осуществить эффективный перенос электронов от ФС2 на электрод, является использование экзогенных редокс-медиаторов, которые переносят электроны от восстановленных хинонов, главным образом с сайта Q_B , на поверхность электрода [23–26]. Существуют также данные о том, что экзогенные акцепторы электронов могут восстанавливаться непосредственно от первичного хинонного акцептора Q_A , минуя вторичный хинон Q_B [26]. Было показано, что экзогенными акцепторами электрона от восстановленного Q_A могут служить феррицианид, синтетические координационные комплексы кобальта, цит c [26].

Larom et al. [27] в экспериментах с тилакоидами из цианобактерий *Synechocystis* sp. PCC 6803 продемонстрировали, что мутация одной аминокислоты (Lys238 субъединицы PsbA) в непосредственной близости от Q_A в ФС2 создает новый путь переноса электронов, в котором заряды передаются от хинона Q_A к добавляемо-

му извне окисленному цит c (цит c^{3+}). Кроме того, на хлоропластах ранее было показано, что фотовосстановление цит c^{3+} может осуществляться либо непосредственно в результате переноса электрона от кофакторов ФС2, либо через супероксидные анион-радикалы ($O_2^{\bullet-}$), образующиеся в результате одноэлектронного восстановления O_2 [28, 29].

На мембранных фрагментах ФС2 из растений Хоробрых с соавт. обнаружили, что при инактивации КОВ фотовосстановление цит c^{3+} в стационарных условиях, связанное с его прямым окислительно-восстановительным взаимодействием с акцепторной стороной ФС2, снижалось, в то время как фотовосстановление цит c^{3+} через $O_2^{\bullet-}$ – активировалось [30]. Авторы продемонстрировали, что фотоокисление цит c^{2+} в мембранных фрагментах ФС2, лишенных КОВ, происходит на донорной стороне РЦ. Была также изучена роль цит c как медиатора переноса электрона между цианобактериальными комплексами ФС2 и фотосистемой 1 (ФС1) в фотоэлектродной системе ФС2/цит c /ФС1 [31]. Было продемонстрировано, что в такой системе восстановленный цит c , образующийся в результате фотоокисления ФС2, служит экзогенным донором электронов для фотоокисленного первичного донора ФС1 P_{700}^+ .

Ранее с помощью прямого электрометрического метода в ядерных комплексах ФС2 из шпината, лишенных Mn-кластера, было продемонстрировано электрогенное восстановление фотоокисленного тирозина Y_Z в результате переноса электрона от экзогенных окислительно-восстановительных медиаторов N,N,N',N' -тетраметил- n -фенилендиамина (ТМФД), 2,6-дихлорфенолиндофенола (ДХФИФ) [32], экзогенного Mn [33] и синтетических Mn-кластеров [34, 35].

Тем не менее до настоящего времени не было исследовано влияние экзогенного цит c^{2+} на кинетику генерации трансмембранной разности электрических потенциалов ($\Delta\psi$) в комплексах ФС2, лишенных марганцевого кластера. Кроме того, в настоящей работе мы также исследовали перенос электрона между акцепторной стороной РЦ и окисленным цит c в препаратах ФС2 с активным КОВ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Ядерные комплексы ФС2 с активным КОВ из шпината получали по методу, описанному в работе [36], путем обработки мембранных фрагментов додецил- β -D-мальтозидом (ДМ) (при соотношении детергент : Хл = 10 : 1) с последующим центрифугированием в градиенте плот-

ности сахарозы (20–40%) с использованием ротора Beckman Vti50 («Beckman Coulter», США) при 210 000 *g* в течение 7 ч. Концентрированные образцы ФС2 ресуспендировали в 0,03 М буфере HEPES-NaOH (pH 7,5), содержащем 0,35 М сахарозу, 0,015 М NaCl, 0,005 М CaCl₂, 0,03% (*m/v*) ДМ (буфер А). Скорость выделения кислорода в нативных комплексах ФС2 при постоянном освещении (1000 μM фотонов $\text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$) в присутствии 0,1 мМ 2,6-дихлоро-*n*-бензохинона и 1 мМ феррицианида калия составляла ~ 1500 мкмоль O₂/мг Хл \times ч⁻¹.

Для удаления марганца и периферических белков ядерные комплексы ФС2 были инкубированы в присутствии 0,85 М буфера Tris-HCl (pH 8,3), содержащего 2 мМ ЭДТА, при слабом освещении в течение 30 мин при 23 °С. Затем суспензию ФС2 трижды промывали 0,03 М буфером HEPES (pH 7,5), содержащим 0,03% (*m/v*) ДМ [32].

Для реконструкции ядерных комплексов ФС2 в липосомы один миллилитр 0,05 М буфера HEPES-NaOH (pH 7,5), содержащего 0,1 М KCl, 1,4% октилглюкопиранозида и 20 мг фосфатидилхолина из сои (тип IV-S; «Sigma-Aldrich», США), озвучивали ультразвуком до прозрачности. Образцы ФС2 смешивали с липидной суспензией при соотношении липид : белок = 50 : 1 по массе (0,4 мг Хл) и инкубировали при 4 °С в течение 30 мин. Удаление детергента осуществляли элюированием суспензии через колонку Sephadex G-50 с использованием 0,03 М буфера HEPES-NaOH (pH 7,5), содержащего 0,005 М CaCl₂ и 0,015 мМ NaCl. В конце процедуры везикулы осаждали при 140 000 *g* при 4 °С в течение 1 ч на ультрацентрифуге Beckman L-90K и ресуспендировали в буфере А без детергента.

Протеолипосомы с окисленным цит *c*, находящимся во внутреннем объеме липосом, получали путем добавления цит *c*³⁺ к среде озвучивания суспензии липидов ультразвуком. В работе использовали цит *c* из сердца лошади производства «Sigma-Aldrich».

Дифференциальный спектр (дितिонит минус феррицианид) использовали для определения доли трехвалентного (3⁺) или двухвалентного (2⁺) состояния цит *c* в 0,03 М буфере HEPES-NaOH (pH 7,5). Концентрацию цит *c*²⁺ рассчитывали по значению оптической плотности в присутствии дितिонита натрия с использованием коэффициента экстинкции, равного 27,6 $\text{cm}^{-1} \times \text{mM}^{-1}$ [37], при 550 нм. Отделение цит *c* от восстановителя проводили элюированием суспензии через колонку с сефадексом G-50 (2,5 \times 10 см). Также было проведено восстановление окисленного цит *c* аскорбатом натрия.

Регистрацию образования трансмембранной разности электрических потенциалов проводили прямым электрометрическим методом с использованием защищенных от света электродов Ag/AgCl в тefлоновой ячейке, состоящей из двух отсеков, разделенных пропитанной фосфолипидом коллоидею пленкой, как описано в работе [38]. Суспензию протеолипосом добавляли в один из отсеков и через 1–1,5 ч перемешивания удаляли избыток образцов, не связавшийся с коллоидею пленкой. После этого раствор в обоих отсеках был заменен буфером А без ДМ. Электроды Ag/AgCl подключали через операционный усилитель Burr Brown 3554BM («Burr-Brown», США) к регистратору переходных процессов CS8012, а затем к персональному компьютеру. В качестве источника ненасыщающих вспышек света (длина волны 532 нм; полуширина импульса 15 нс; энергия импульса 50 мДж) использовали лазер Quantel Nd («Les Ulis», Франция). Все измерения проводили при 23 °С.

Разложения кинетических кривых на индивидуальные экспоненты осуществляли с использованием программных пакетов Pluk [39] и Origin («OriginLab Corporation», США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На рис. 1 показаны типичные индуцированные лазерной вспышкой электрические ответы в протеолипосомах, содержащих кислород-выделяющие ядерные комплексы ФС2, ассоциированные с коллоидею пленкой в отсутствие цит *c* (см. обзоры [40, 41]). Видно, что под действием вспышки света наблюдается образование $\Delta\psi$ со знаком минус внутри протеолипосом. Увеличение амплитуды $\Delta\psi$ на $\sim 10\%$ при добавлении непроникающего через мембраны протеолипосом дितिонита натрия указывает на то, что около 90% комплексов ФС2 ориентированы донорной стороной во внешнюю водную фазу [32, 40]. Наблюдаемая в кинетике фотоэлектрического ответа неразрешимая во времени фаза $\Delta\psi$ обусловлена разделением зарядов между P₆₈₀ и Q_A (200–250 пс) и ревосстановлением P₆₈₀⁺ путем переноса электрона от тирозина Y_Z, происходящего за 30–200 нс [11, 12]. Временное разрешение использовавшейся установки составляет ~ 200 нс [38].

Кинетика спада $\Delta\psi$ достаточно хорошо аппроксимируется двумя кинетическими компонентами с $\tau_1 \approx 0,6$ с ($\sim 35\%$) и $\tau_2 \approx 5,6$ с ($\sim 65\%$), показано на рис. 1, а. Медленная компонента обусловлена рекомбинацией электронов между КОВ в состояниях S₂ и Q_A⁻ в ответ на первую вспышку света [24, 41], в то время как более

быстрая составляющая, вероятно, связана с рекомбинацией зарядов между Q_A^- и Y_Z^* [41]. Полученный результат свидетельствует в пользу того, что в протеолипосомах большинство комплексов ФС2 способны восстанавливать Y_Z^* в результате переноса электронов от КОВ. Следует отметить, что использованные нами образцы ядерных комплексов ФС2 не содержат терминального хинонного акцептора Q_B [36].

Тот факт, что донорная сторона ядерного комплекса ФС2 локализована снаружи протеолипосомальной мембраны, делает эту систему удобной для изучения ее взаимодействия с растворимым восстановленным цит c^{2+} как донором электрона. В то же время для исследования акцепторных свойств цит c его окисленная форма, цит c^{3+} , должна быть локализована внутри протеолипосом, содержащих ядерные комплексы ФС2.

Фотоэлектрические ответы в адаптированных к темноте кислород-выделяющих комплексах ФС2, встроенных в липосомальную мембрану в отсутствие (кривая 1) и в присутствии (кривая 2) цит c^{3+} , показаны на рис. 1, б. Как уже было отмечено выше, в ответ на лазерную вспышку света быстрая фаза генерации электрического ответа ($\tau \sim 0,2$ мкс) обусловлена переносом электрона от тирозина Y_Z к первичному хинону Q_A [42, 43]. В присутствии 30 мкМ цит c^{3+} внутри протеолипосом (кривая 2) индуцированная лазерной вспышкой быстрая кинетически неразрешимая во времени компонента генерации

$\Delta\Psi$ сопровождалась появлением дополнительной электрогенной фазы в субмиллисекундном временном диапазоне. Анализ разности между фотоэлектрическими ответами в отсутствие и в присутствии цит c^{3+} , продемонстрированной на вставке к рис. 1, б, выявил кинетическую компоненту со временем жизни $\tau \sim 40$ мкс и относительным вкладом $\sim 10\%$ в общую амплитуду $\Delta\Psi$. Дальнейшее увеличение концентрации цит c^{3+} внутри протеолипосом (до 50 мкМ) не влияло на кинетику и амплитуду дополнительной фазы генерации $\Delta\Psi$, в то время как при уменьшении концентрации цит c^{3+} до 20 мкМ кинетика дополнительной фазы была несколько медленнее (~ 65 мкс) (данные не приведены). Как упоминалось выше, фотовосстановление цит c^{3+} может происходить (i) либо через прямой перенос электрона от восстановленного хинонного акцептора, (ii) либо косвенно через супероксид-анион-радикал [27–30, 44]. Добавление супероксиддисмутазы (СОД) (50 Ед/мл), а также включение восстановленного цит c^{2+} внутрь протеолипосом не влияло на генерацию $\Delta\Psi$ (данные не приведены). Полученные результаты демонстрируют, что дополнительная фаза генерации $\Delta\Psi$, наблюдаемая в присутствии окисленного цит c , обусловлена электрогенным восстановлением цит c^{3+} в результате переноса электрона от Q_A^- .

В следующей части работы мы исследовали возможную роль влияния цит c^{2+} как экзогенного донора электронов на генерацию $\Delta\Psi$ в протео-

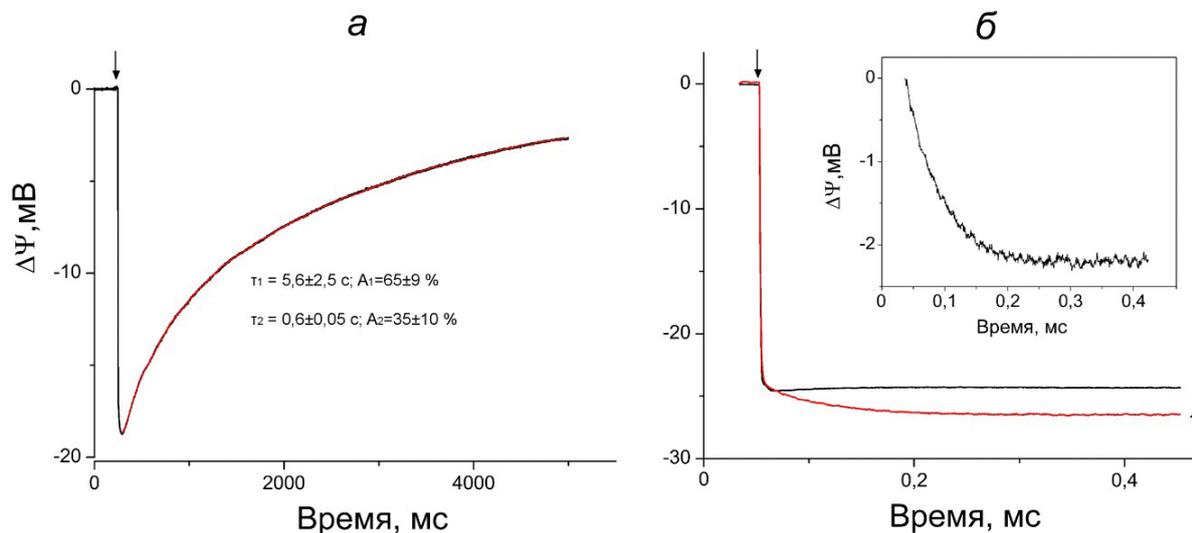


Рис. 1. Влияние экзогенного растворимого цит c^{3+} на генерацию $\Delta\Psi$, индуцированную единичной лазерной вспышкой света в протеолипосомах, содержащих ядерные комплексы ФС2 с активным КОВ. Цит c^{3+} в качестве внешнего акцептора электронов был локализован внутри протеолипосом. *a* – Кинетика спада $\Delta\Psi$ в отсутствие цит c ; *б* – кинетика нарастания $\Delta\Psi$ в отсутствие (кривая 1) и в присутствии 30 мкМ цит c^{3+} (кривая 2). Вставка – разность между кривыми 2 и 1. Инкубационная среда: 0,03 М буфер НЕРЕС- NaOH (pH 7,5), 0,015 М NaCl , 0,005 М CaCl_2 , 0,35 М сахароза. Стрелки здесь и далее обозначают лазерные вспышки

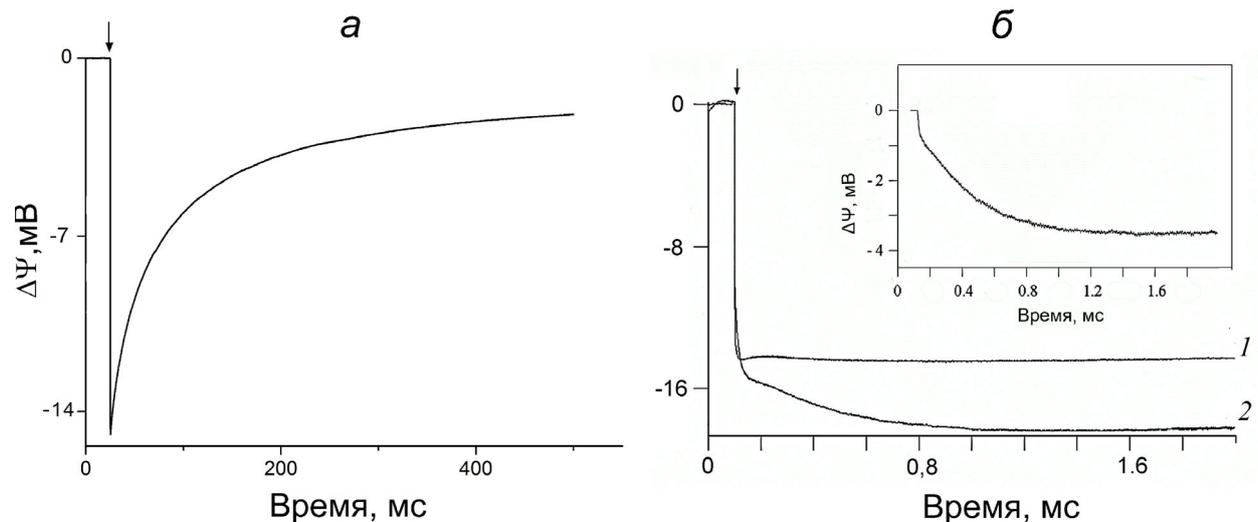


Рис. 2. Влияние цит c^{2+} на кинетику генерации $\Delta\Psi$ в протеолипосомах, содержащих ядерные комплексы ФС2, лишённые ионов марганца и периферических белков (Tris-обработанные). *a* – Кинетика спада $\Delta\Psi$ в отсутствие цит c ; *б* – кинетика нарастания $\Delta\Psi$ в отсутствие (кривая 1) и в присутствии 20 мкМ цит c^{2+} (кривая 2). Вставка – разница между кривыми 2 и 1. Условия эксперимента соответствуют таковым на рис. 1

липосомах с ядерными комплексами ФС2, лишёнными ионов марганца. В условиях инактивации КОВ природный донор электронов для фотоокисленного тирозина Y_Z отсутствует, и время жизни радикала Y_Z^{\bullet} значительно увеличивается; в этих препаратах Y_Z служит основным донором электронов для фотоокисленного P_{680} . На рис. 2, *a* видно, что фотоэлектрический ответ спадает значительно быстрее, чем в случае нативных ядерных комплексов ФС2 (с характерным временем ~ 50 мс), что обусловлено рекомбинацией зарядов между Q_A^- и Y_Z^{\bullet} [32, 45, 46].

Фотоэлектрические сигналы в ответ на лазерные вспышки света в адаптированных к темноте ядерных комплексах ФС2 в отсутствие (кривая 1) и в присутствии 20 мкМ цит c^{2+} (кривая 2) показаны на рис. 2, *б*. В отсутствие цит c^{2+} наблюдалась только быстрая кинетически неразрешенная фаза генерации $\Delta\Psi$ за счет переноса электрона от P_{680} на Q_A и последующего восстановления P_{680}^+ в результате переноса электрона от Y_Z . Добавление цит c^{2+} приводило к появлению дополнительной компоненты нарастания в кинетике фотосовета. Анализ различия между фотоэлектрическими ответами, индуцированными вспышкой света в отсутствие и в присутствии цит c^{2+} (вставка к рис. 2, *б*), выявил кинетическую составляющую с $\tau \sim 70$ мкс и относительной амплитудой $\sim 20\%$ от общей амплитуды сигнала $\Delta\Psi$. Эта компонента была приписана векторному переносу электрона от цит c^{2+} к фотоокисленному Y_Z . Дальнейшее увеличение концентрации растворимого цит c^{2+} (до 50 мкМ) не влияло на кинетику $\Delta\Psi$ (данные не

приведены). Амплитуда дополнительной медленной фазы изменялась незначительно во всем исследованном диапазоне концентраций цит c (от 5 до 50 мкМ), в то время как кинетика – ускорялась, с ~ 130 мкс при концентрации цит c^{2+} , равной 5 мкМ, до 70 мкс – при концентрации цит c^{2+} 20 мкМ.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Индукцированное лазерной вспышкой возбуждение реакционного центра ФС2 в протеолипосомах приводит к генерации $\Delta\Psi$. С помощью прямого электрометрического метода на протеолипосомах, содержащих ядерные комплексы ФС2 с активным КОВ в присутствии окисленного цит c , погруженного внутрь липидной везикулы, была зарегистрирована дополнительная фаза нарастания $\Delta\Psi$. Эта электрогенная фаза (~ 40 мкс, $\sim 10\%$) была приписана восстановлению цит c^{3+} от первичного хинонного акцептора Q_A^- , поскольку: (i) в присутствии цит c^{2+} этого эффекта не наблюдалось; (ii) используемые образцы не содержали Q_B ; (iii) эта электрогенная фаза была нечувствительна к СОД.

Ранее Хоробрых с соавт. [30] на основании данных, полученных на кислород-выделяющих мембранных фрагментах ФС2 с помощью измерения кинетики световых редокс-превращений цит c и фотоиндуцированных изменений выхода флуоресценции хлорофилла (ΔF), предположили, что восстановление добавленного цит c^{3+} может наблюдаться в результате переноса электро-

на от кофакторов акцепторного участка реакционного центра. Efrati et al. [31] показали, что освещение модифицированных ФС2/цит c /ФС1 золотых электродов приводит к каскадному переносу электронов, причем фотовозбуждение ФС2 приводит к выделению O_2 и восстановлению цит c с последующим донированием электронов от ФС1 на электрод и восстановлением P_{700}^+ от цит c^{2+} .

Помимо цит c , силикомолибдат, $Co[(terpy)_2]^{3+}$, Hg^{2+} и феррицианид также могут функционировать как акцепторы электронов для Q_A^- [47]. Окислительно-восстановительные медиаторы, такие как метиленовый синий (МС), ДХФИФ или ТМФД, добавленные в реакционную среду, также способны окислять Q_A^- [32]. Фактически даже при концентрации восстановленной формы ТМФД 1 мМ (в присутствии избытка аскорбата) концентрация его окисленной формы составляет 1 мкМ (среднеточечный потенциал (E_m) для пары ТМФД/ТМФД⁺ и аскорбата при pH 7,0 составляет ± 260 мВ и ± 80 мВ соответственно). Эта концентрация, по крайней мере, в пять раз превышает концентрацию реакционных центров ФС2 (обычно около 0,2–0,25 мкМ РЦ), и ТМФД⁺ может непосредственно окислять анионный семихинон Q_A во фракции ФС2 перед вспышкой света. Отсутствие генерации $\Delta\Psi$ при переносе электрона между Q_A^- и окисленными формами МС, ДХФИФ или ТМФД [32], в отличие от цит c^{3+} (рис. 1, б), может быть связано с особенностями их взаимодействия с реакционным центром ФС2 на акцепторной стороне.

Известно, что в образцах ФС2, лишенных марганцевого кластера и периферических белков (PsbO, PsbP, PsbQ), Y_Z находится в относительно гидрофильной среде ближе к границе белок–вода по сравнению с интактным комплексом ФС2. Наши ранние исследования, проведенные в присутствии восстановленных медиаторов ТМФД и ДХФИФ [32, 41] в Mn-лишенных образцах ФС2 продемонстрировали, что быстрая генерация $\Delta\Psi$, связанная с векторным переносом электрона между Y_Z и Q_A , сопровождается дополнительной электрогенной фазой в миллисекундном временном диапазоне. Вклад этой фазы в общий электрогенез составлял ~20%.

На основании данных, полученных ранее для некоторых редокс-медиаторов и синтетических трехъядерных или двухъядерных марганцевых кластеров, мы пришли к заключению, что электрогенное восстановление Y_Z^{\bullet} осуществляется в результате векторного переноса электрона от границы раздела белок–вода до погруженного в белок тирозина Y_Z [32–35, 41]. Поскольку вклады $\Delta\Psi$ при добавлении искусственных до-

норов электронов [41] и в присутствии цит c^{2+} (настоящая работа) практически одинаковы, мы сделали вывод, что электрогенное восстановление Y_Z^{\bullet} от цит c^{2+} также осуществляется в результате внутрибелкового векторного переноса электрона.

Наличие аналогичной фазы цит c -зависимой генерации $\Delta\Psi$ на донорной стороне было также ранее продемонстрировано в изолированных комплексах РЦ из несерной пурпурной бактерии *Rhodospirillum rubrum* [48, 49], а также в комплексах ФС1 из цианобактерий [50]. Относительный вклад дополнительной электрогенной фазы $\Delta\Psi$ в общий электрогенез в случае бактериальных РЦ составлял 22–24% в присутствии митохондриального цит c (при концентрации >5–10 мкМ) и ~16% – в присутствии 7 мкМ цит c_2 из *R. rubrum* [49]. При этом характерное время этой фазы составляло >150 мкс. Что касается кинетики дополнительной электрогенной фазы в комплексах ФС1 в присутствии растворимого цит c , то она хорошо аппроксимировалась двумя кинетическими компонентами с $\tau_1 \approx 25$ мкс и $\tau_2 \approx 200$ мкс и относительными вкладами ~40% и ~60% соответственно.

Предполагаемая схема электрогенного восстановления цит c^{3+} от Q_A^- (а) и окисления цит c^{2+} тирозином Y_Z^{\bullet} (б) на акцепторной и донорной сторонах комплексов ФС2 соответственно представлена на рис. 3. В случае восстановления цит c^{3+} были использованы протеолипосомы, содержащие ФС2 с активным КОВ, при этом цит c^{3+} находился внутри протеолипосом (рис. 3, а), тогда как в случае окисления цит c^{2+} изучались ядерные комплексы ФС2, лишенные ионов марганца и трех внешних субъединиц (рис. 3, б); при этом цит c^{2+} добавляли во внешнюю водную фазу.

Таким образом, измерение электрических сигналов в ответ на однократное разделение зарядов внутри мембранных белков РЦ может предоставить фундаментальную информацию о механизмах переноса заряда [40, 51, 52]. Можно предположить, что цит c^{3+} образует комплекс с акцепторной стороной поверхности белка ФС2 на расстоянии ~17 Å (согласно предварительным данным по моделированию) между гемом и первичным акцептором хинона Q_A , что обеспечивает быстрый перенос электрона (время жизни ~40 мкс) от Q_A^- до цит c^{3+} . Относительная амплитуда величины $\Delta\Psi$, сопровождающая эту реакцию, составляет ~10% от общего фотосоответа.

С другой стороны, становится очевидным, что восстановленный цит c^{2+} является чрезвычайно эффективным донором электронов для тирозина Y_Z^{\bullet} в образцах ФС2, лишенных ионов марганца. При этом относительная амплитуда

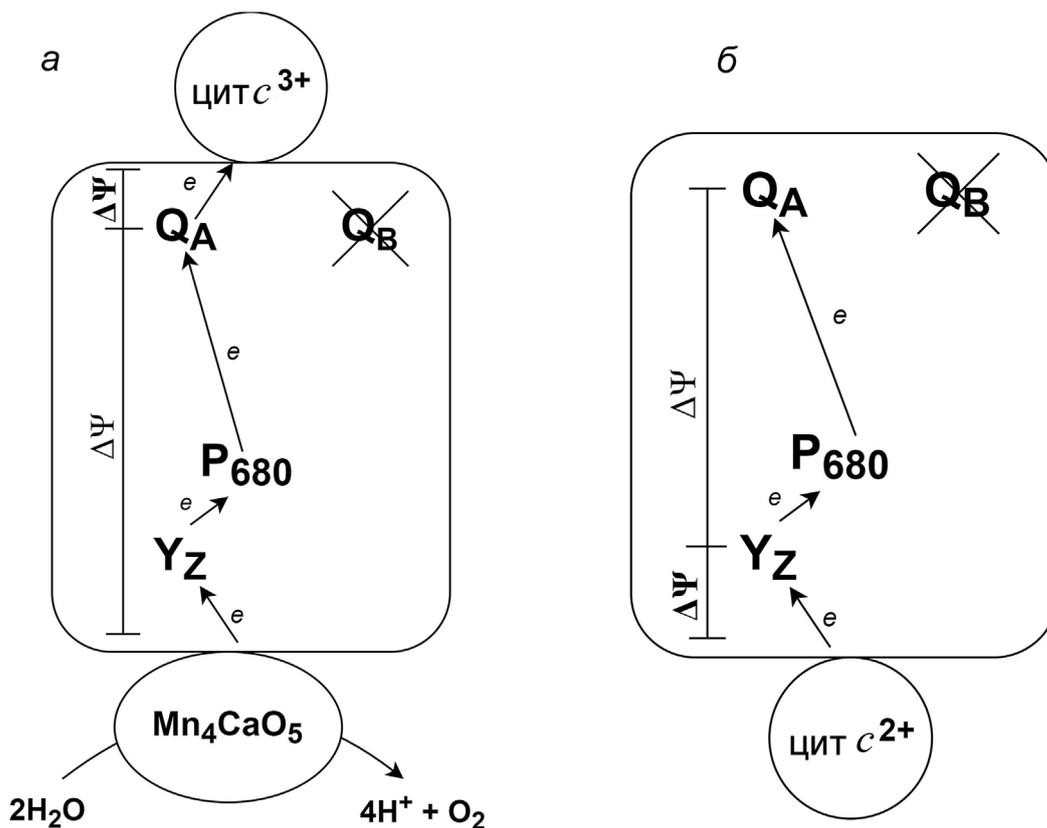


Рис. 3. Схема электрогенных реакций в интактных комплексах ФС2 с активными КОВ (а) и комплексах ФС2, лишенных Mn-кластера и периферических белков (б)

электрогенной фазы, обусловленной переносом электрона от цит c^{2+} к тирозину YZ , составляет ~20%. Амплитуда сигнала примерно равна вкладу $\Delta\Psi$, который наблюдался ранее при восстановлении фотоокисленного YZ от искусственных доноров электронов – ТМФД, ДХФИФ и синтетических Mn-содержащих кластеров [32, 34, 35].

Таким образом, полученные в настоящей работе данные демонстрируют, что окисленная и восстановленная формы экзогенного цит c могут служить весьма эффективными акцептором и донором электрона для ФС2 соответственно. Результаты исследования электрогенных реакций между реакционным центром ФС2 и цит c^{2+} или цит c^{3+} могут быть использованы при создании фотоэлектрохимических систем преобразо-

вания солнечной энергии на основе фотосинтетических пигмент-белковых комплексов.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (№ проекта 19-14-00366) и государственного задания «Химико-физические механизмы взаимодействия интенсивного лазерного излучения с биологическими системами» (№ АААА-А19-119012990175-9).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Barber, J. (2016) Photosystem II: an enzyme of global significance, *Biochem. Soc. Trans.*, **34**, 619-631, doi: 10.1042/BST0340619.
2. Govindjee, Kern, J. F., Messinger, J., and Whitmarsh, J. (2010) Photosystem II, in: *Enycl., Life Sci.*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, doi: 10.1002/9780470015902.a0000669.pub2.
3. Najafpour, M. M., Renger, G., Hołyńska, M., Moghaddam, A. N., Aro, E. M., et al. (2016) Manganese compounds as water-oxidizing catalysts: from the natural

- water-oxidizing complex to nanosized manganese oxide structures, *Chem. Rev.*, **116**, 2886-2936, doi: 10.1021/acs.chemrev.5b00340.
4. Lubitz, W., Chrysinina, M., and Cox, N. (2019) Water oxidation in photosystem II, *Photosynth. Res.*, **142**, 105-125, doi: 10.1007/s11120-019-00648-3.
 5. Ferreira, K. N., Iverson, T. M., Maghlaoui, K., Barber, J., and Iwata, S. (2004) Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving center, *Science*, **303**, 1831-1838, doi: 10.1126/science.1093087.
 6. Guskov, A., Gabdulkhakov, A., Broser, M., Glöckner, C., Hellmich, J., et al. (2010) Recent progress in the crystallographic studies of photosystem II, *ChemPhysChem*, **11**, 1160-1171, doi: 10.1002/cphc.200900901.
 7. Umena, Y., Kawakami, K., Shen, J. R., and Kamiya, K. (2011) Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at a resolution of 1.9 Å, *Nature*, **473**, 55-60, doi: 10.1038/nature09913.
 8. Cao, P., Su, X., Pan, X., Liu, Z., Chang, W., and Li, M. (2018) Structure, assembly and energy transfer of plant photosystem II supercomplex, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1859**, 633-644, doi: 10.1016/j.bbabi.2018.03.007.
 9. Yano, J., Kern, J., Sauer, K., Latimer, M. J., Pushkar, Y., Biesiadka, J., et al. (2006) Where water is oxidized to dioxygen: Structure of the photosynthetic Mn₄Ca cluster, *Science*, **314**, 821-825, doi: 10.1126/science.1128186.
 10. Suga, M., Akita, F., Hirata, K., Ueno, G., Murakami, H., Nakajima, Y., et al. (2015) Native structure of photosystem II at 1.95 Å resolution viewed by femtosecond X-ray pulses, *Nature*, **517**, 99-103, doi: 10.1038/nature13991.
 11. Renger, G., and Holzwarth, A. R. (2005) Primary electron transfer, in: *Photosystem II*, Springer-Verlag, pp. 139-175, doi: 10.1007/1-4020-4254-x_8.
 12. McEvoy, J. P., and Brudvig, G. W. (2006) Water-splitting chemistry of photosystem II, *Chem. Rev.*, **106**, 4455-4483, doi: 10.1021/cr0204294.
 13. Dau, H., and Haumann, M. (2007) Eight steps preceding O-O bond formation in oxygenic photosynthesis-A basic reaction cycle of the Photosystem II manganese complex, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1767**, 472-483, doi: 10.1016/j.bbabi.2007.02.022.
 14. Rappaport, F., and Diner, B. (2008) Primary photochemistry and energetics leading to the oxidation of the (Mn)₄Ca cluster and to the evolution of molecular oxygen in Photosystem II, *Coord. Chem. Rev.*, **252**, 259-272, doi: 10.1016/j.ccr.2007.07.016.
 15. Muh, F., and Zouni, A. (2011) Light-induced water oxidation in photosystem II, *Front. Biosci.*, **16**, 3072-3132, doi: 10.2741/3900.
 16. Shevela, D., and Messinger, J. (2012) Probing the turnover efficiency of photosystem II membrane fragments with different electron acceptors, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1817**, 1208-1212, doi: 10.1016/j.bbabi.2012.03.038.
 17. Cardona, T., Sedoud, A., Cox, N., and Rutherford, A. W. (2012) Charge separation in Photosystem II: a comparative and evolutionary overview, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1817**, 26-43, doi: 10.1016/j.bbabi.2011.07.012.
 18. Barber, J. (2017) Photosynthetic water splitting by the Mn₄Ca²⁺O_x catalyst of photosystem II: its structure, robustness and mechanism, *Q. Rev. Biophys.*, **50**, e13, doi: 10.1017/S0033583517000105.
 19. Brinkert, K., Le Formal, F., Li, X., Durrant, J., Rutherford, A. W., and Fantuzzi, A. (2016) Photocurrents from photosystem II in a metal oxide hybrid system: Electron transfer pathways, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1857**, 1497-1505, doi: 10.1016/j.bbabi.2016.03.004.
 20. Nguyen, K., and Bruce, B. D. (2014) Growing green electricity: progress and strategies for use of photosystem I for sustainable photovoltaic energy conversion, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1837**, 1553-1566, doi: 10.1016/j.bbabi.2013.12.013.
 21. Musazade, E., Voloshin, R., Brady, N., and Mondal, J. (2018) Biohybrid solar cells: Fundamentals, progress, and challenges, *J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.*, **35**, 134-156, doi: 10.1016/j.jphotochemrev.2018.04.001.
 22. Zhang, J. Z., and Reisner, E. (2020) Advancing photosystem II photoelectrochemistry for semi-artificial photosynthesis, *Nat. Rev. Chem.*, **4**, 6-21, doi: 10.1038/s41570-019-0149-4.
 23. Badura, A., Kothe, T., Schuhmann, W., and Rögner, M. (2011) Wiring photosynthetic enzymes to electrodes, *Energy Environ. Sci.*, **4**, 3263-3274, doi: 10.1039/c1ee01285a.
 24. Kato, M., Zhang, J. Z., Paul, N., and Reisner, E. (2014) Protein film photoelectrochemistry of the water oxidation enzyme photosystem II, *Chem. Soc. Rev.*, **43**, 6485-6497, doi: 10.1039/c4cs00031e.
 25. Yehezkeili, O., Tel-Vered, R., Michaeli, D., Willner, I., and Nechushtai, R. (2014) Photosynthetic reaction center-functionalized electrodes for photo-bioelectrochemical cells, *Photosynth. Res.*, **120**, 71-85, doi: 10.1007/s11120-013-9796-3.
 26. Wiwczar, J., and Brudvig, G. W. (2017) Alternative electron acceptors for photosystem II, in *Photosynthesis: Structures, Mechanisms, and Applications* (Hou, H. J. M., et al., eds.) Springer, doi: 10.1007/978-3-319-48873-8_4.
 27. Larom, S., Salama, F., Schuster, G., and Adir, N. (2010) Engineering of an alternative electron transfer path in photosystem II, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 9650-9655, doi: 10.1073/pnas.1000187107.
 28. Nelson, N., Nelson, H., and Racker, E. (1972) Photoreaction of FMN-Tricine and its participation in photophosphorylation, *Photochem. Photobiol.*, **16**, 481-489, doi: 10.1111/j.1751-1097.1972.tb06316.x.
 29. Asada, K., Kiso, K., and Yoshikawa, K. (1974) Univalent reduction of molecular oxygen by spinach chloroplasts on illumination, *J. Biol. Chem.*, **249**, 2175-2181, doi: 10.1016/s0021-9258(19)42815-9.
 30. Khorobrykh, A. A., Yanykin, D. V., and Klimov, V. V. (2018) Photooxidation and photoreduction of exogenous cytochrome c by photosystem II preparations after various modifications of the water-oxidizing complex, *Photosynthetica*, **56**, 244-253, doi: 10.1007/s11099-017-0762-8.
 31. Efrati, A., Tel-Vered, R., Michaeli, D., Nechushtai, R., and Willner, I. (2013) Cytochrome c-coupled photosystem I and photosystem II (PSI/PSII) photo-bioelectrochemical cells, *Energy Environ. Sci.*, **6**, 2950, doi: 10.1039/C3EE41568F.
 32. 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.
 33. Kurashov, V. N., Lovyagina, E. R., Shkolnikov, D. Yu., Solntsev, M. K., Mamedov, M. D., and Semin, B. K. (2009) Investigation of the low-affinity oxidation site for exogenous electron donors in the Mn-depleted photosystem II complexes, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1787**, 1492-1498, doi: 10.1016/j.bbabi.2009.07.002.
 34. Kurashov, V. N., Allakhverdiev, S. I., Zharmukhamedov, S. K., Nagata, T., Klimov, V. V., et al. (2009) Electrogenic reactions on the donor side of Mn-depleted photosystem II core particles in the presence of MnCl₂ and synthetic trinuclear Mn-complexes, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **8**, 162-166, doi: 10.1039/b813981d.
 35. Vitukhnovskaya, L. A., Zharmukhamedov, S. K., Najafpour, M. M., Allakhverdiev, S. I., Semenov, A. Y., and Mamedov, M. D. (2018) Electrogenic reactions in Mn-depleted photosystem II core particles in the presence of

- synthetic binuclear Mn complexes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **503**, 222-227, doi: 10.1016/j.bbrc.2018.06.006.
36. Haag, E., Irrgang, K.-D., Boekema, E. J., and Renger, G. (1990) Functional and structural analysis of photosystem II core complexes from spinach with high oxygen evolution capacity, *Eur. J. Biochem.*, **189**, 47-53, doi: 10.1111/j.1432-1033.1990.tb15458.x.
 37. Margoiliash, E. (1954) The use of ion exchangers in the preparation and purification of cytochrome *c*, *Biochem. J.*, **56**, 529-535, doi: 10.1042/bj0560529.
 38. Semenov, A. Yu., Mamedov, M. D., and Chamorovsky, S. K. (2006) Electrogenic reactions associated with electron transfer in photosystem I, in *Advances in Photosynthesis and Respiration Series. Photosystem I: The Light-Driven, Plastocyanin: Ferredoxin Oxidoreductase* (Golbeck, J. H., ed) Springer, pp. 319-424.
 39. Kalaidzidis, L., Gavrilov, A. V., Zaitsev, P. V., Kalaidzidis, A. L., and Korolev, E. V. (1997) PLUK – an environment for software development, *Program. Comput. Softw.*, **23**, 206-212.
 40. Semenov, A. Y., Cherepanov, D. A., and Mamedov, M. D. (2008) Electrogenic reactions and dielectric properties of photosystem II, *Photosynth. Res.*, **98**, 121-130, doi: 10.1007/s11120-008-9377-z.
 41. Mamedov, M. D., Kurashov, V. N., Cherepanov, D. A., and Semenov, A. Y. (2010) Photosystem II: Where does the light-induced voltage come from? *Front. Biosci.*, **15**, 1007-1017, doi: 10.2741/3658.
 42. Мамедов М. Д., Ловягина Е. Р., Верховский М. И., Семенов А. Ю., Черепанов Д. А., Шинкарев В. П. (1994) Генерация разности электрических потенциалов фотосистемой II термофильных цианобактерий, *Биохимия*, **59**, 685-689.
 43. Haumann, M., Mulkidjanian, A., Junge, W. (1997) Electrogenicity of electron and proton transfer at the oxidizing side of photosystem II, *Biochemistry*, **36**, 9304-9315, doi: 10.1021/bi963114p.
 44. Larom, S., Kallmann, D., Saper, G., Pinhasi, R., Rothschild, A., et al. (2015) The Photosystem II D1-K238E mutation enhances electrical current production using cyanobacterial thylakoid membranes in a bio-photo-electrochemical cell, *Photosynth. Res.*, **126**, 161-169, doi: 10.1007/s11120-015-0075-3.
 45. Rappaport, F., and Lavergne, J. (1997) Charge recombination and proton transfer in manganese-depleted photosystem II, *Biochemistry*, **36**, 15294-15302, doi: 10.1021/bi971287o.
 46. 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.
 47. Ulas, G., and Brudvig, G. W. (2011) Redirecting electron transfer in photosystem II from water to redox-active metal complexes, *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 13260-13263, doi: 10.1021/ja2049226.
 48. Drachev, L. A., Kaminskaya, O. P., Konstantinov, A. A., Kotova, E. A., Mamedov, M. D., et al. (1986) The effect of cytochrome *c*, hexammineruthenium and ubiquinone-10 on the kinetics of photoelectric responses of *Rhodospirillum rubrum* reaction centres, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **848**, 137-146, doi: 10.1016/0005-2728(86)90169-6.
 49. Каминская О. П., Семенов А. Ю. (2021) Сотрудничество с Александром Константиновым в исследовании механизмов электрогенных реакций в бактериальных фотосинтетических реакционных центрах, *Биохимия*, **86**, 6-13, doi: 10.31857/s0320972521010012.
 50. Mamedov, M. D., Gadzhieva, R. M., Gourovskaia, K. N., Drachev, L. A., and Semenov, A. Y. (1996) Electrogenicity at the donor/acceptor sides of cyanobacterial photosystem I, *J. Bioenerg. Biomembr.*, **28**, 517-522, doi: 10.1007/BF02110441.
 51. Kim, I., Chakrabarty, S., Brzezinski, P., and Warshel, A. (2014) Modeling gating charge and voltage changes in response to charge separation in membrane proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 11353-11358, doi: 10.1073/pnas.1411573111.
 52. Moser, C. C., Keske, J. M., Warncke, K., Farid, R. S., and Dutton, P. L. (1992) Nature of biological electron transfer, *Nature*, **355**, 796-802, doi: 10.1038/355796a0.

GENERATION OF PHOTOELECTRIC RESPONSES BY PHOTOSYSTEM II CORE COMPLEXES IN THE PRESENCE OF EXTERNALLY ADDED CYTOCHROME *c*

L. A. Vitukhnovskaya^{1,2}, R. A. Simonyan¹, A. Yu. Semenov^{1,2}, and M. D. Mamedov^{1*}

¹ Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow State University, 119992 Moscow, Russia; e-mail: mahirmamedov@yandex.ru

² Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, 119991 Moscow, Russia

The effect of exogenous cytochrome *c* (cyt *c*) on kinetics of photoelectric responses ($\Delta\Psi$) of two types of photosystem II (PSII) core complexes (intact – PSII with active water-oxidizing complex and Mn-depleted complex) reconstituted into liposomes has been investigated by direct electrometric technique. PSII complexes were localized in the proteoliposome membranes with their donor side outward. An additional electrogenic phase was observed in the kinetics of $\Delta\Psi$ generation in response to a laser flash besides the main fast ($<0.3 \mu\text{s}$) electrogenic component due to electron transfer from the redox-active tyrosine Y_Z to the primary quinone acceptor Q_A in the presence of oxidized cyt *c* (cyt c^{3+}) entrapped in the internal space of proteoliposomes with intact PSII complexes. This component with characteristic time $\tau \approx 40 \mu\text{s}$ and relative amplitude of $\sim 10\%$ of the total $\Delta\Psi$ was attributed to the vectorial electron transfer from Q_A^- to cyt c^{3+} serving as an external acceptor. An additional electrogenic component with $\tau \sim 70 \mu\text{s}$ and a relative amplitude of $\sim 20\%$ of the total $\Delta\Psi$ also appeared in the kinetics of $\Delta\Psi$ formation, when cyt c^{2+} was added to the suspension of proteoliposomes containing Mn-depleted PSII core complexes. This component was attributed to the electrogenic transfer of an electron from cyt c^{2+} to photooxidized tyrosine Y_Z . These data imply that cyt c^{3+} serves as a very effective exogenous electron acceptor for Q_A^- in the case of intact PSII core complexes, and cyt c^{2+} is an extremely efficient artificial electron donor for Y_Z in the Mn-depleted PSII. The obtained data on the roles of cyt c^{2+} and cyt c^{3+} as an electron donor and acceptor for PSII, respectively, can be used to develop hybrid photoelectrochemical solar energy-converting systems based on photosynthetic pigment–protein complexes.

Keywords: photosystem II, proteoliposomes, photoelectric response, electron transfer, cytochrome *c*