

## МЕХАНИЗМ СНИЖЕНИЯ КИСЛОРОД-ВЫДЕЛЯЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ ФОТОСИСТЕМЫ 2 ПРИ КИСЛЫХ pH

Е.Р. Ловягина, Б.К. Сёмин

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», Москва, Россия, *Elena.Lovyagina@gmail.com*

**Аннотация.** В представленной работе исследован механизм ингибирующего действия кислых pH на активность кислород-выделяющего комплекса (КВК) мембранных препаратов фотосистемы 2 (ФС2). Полученные результаты показывают, что при обработке препаратов ФС2 средой с кислыми pH в интервале 3,5 – 5,0 наряду с необратимыми нарушениями происходит обратимая диссоциация двух периферических белков PsbP и PsbQ и экстракция катиона  $\text{Ca}^{2+}$  из КВК. Активность КВК может быть восстановлена путем изменения pH среды инкубации препаратов ФС2 на оптимальное (pH 6,4–6,5) в присутствии диссоциировавших периферических белков, либо путем добавления экзогенного  $\text{Ca}^{2+}$  при оптимальных pH.

**Ключевые слова:** фотосистема 2, кислород-выделяющий комплекс, pH

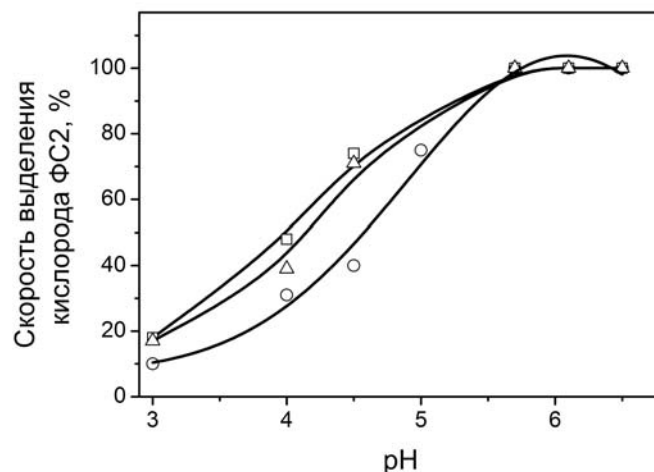
**DOI:** 10.31255/978-5-94797-319-8-471-474

**Введение.** pH зависимость выделения кислорода мембранными препаратами фотосистемы 2 (ФС2) была исследована в ряде работ и достаточно хорошо описана [Damoder, Dismukes, 1984; Vass, Styring, 1991; Haddy et al., 1999; Schiller, Dau, 2000; Bernat et al., 2002; Semin et al., 2004]. Кривая pH зависимости имеет колоколообразную форму с максимумом в области 6,0 – 6,5. При увеличении (область щелочных pH) или уменьшении pH (кислотная область) эффективность работы кислород-выделяющего комплекса (КВК) уменьшается, достигая нулевых значений при величине pH около 4,0 и около 8,0, соответственно [Schiller, Dau, 2000]. Однако механизм влияния pH на реакцию фотолиза воды и синтеза молекулярного кислорода практически не исследован. Предполагается, что в щелочной среде нарушается функционирование анионов хлора в КВК [Schiller, Dau, 2000]. В кислой среде ингибирование активности ФС2 может быть частично связано с экстракцией катиона  $\text{Ca}^{2+}$  из КВК [Krieger, Weis 1992]. В представленной работе мы исследовали механизм ингибирующего действия кислых pH на активность КВК.

**Материалы и методы.** Исследования проводили на мембранных препаратах ФС2 с активным КВК, выделенных из шпината согласно методике [Ghanotakis et al., 1984]. Препараты хранили при температуре -80 °C в буфере А, содержащем 15 mM NaCl, 400 mM сахарозу и 50 mM Mes-NaOH, pH 6,5. В этом же буфере проводили все измерения. Инкубацию препаратов ФС2 в буфере с исследуемым pH проводили следующим образом. ФС2 с концентрацией хлорофилла 50 мкг/мл помещали в прогретый до 22 °C буфер, содержащий 15 mM NaCl, 400 mM сахарозу и 50 mM Mes-NaOH (интервал pH 4,0 – 6,5) либо в 15 mM цитратный буфер, содержащий 15 mM NaCl, 400 mM сахарозу (pH 3,0). Препараты инкубировали в течение 15 мин в темноте, затем резко охлаждали во льду 3 мин, центрифугировали при 16000 g 15 мин и суспендировали в буфере А. Скорость выделения кислорода измеряли амперометрически с помощью закрытого платинового электрода Кларка при 25 °C. В качестве акцептора электронов использовали 2,6-дихлор-*n*-бензохинон (200 мкМ). Концентрация хлорофилла составляла 10 мкг/мл.

**Результаты и обсуждение.** Исследования эффекта pH среды на реакцию выделения кислорода ФС2 с нативным кислород-выделяющим комплексом стандартным методом, когда скорость выделения  $\text{O}_2$  измеряется в буфере с

исследуемым рН, указывают на значительный ингибирующий эффект кислых рН по сравнению с оптимальными для выделения кислорода рН 6,0–6,5. При рН 4,5 кислород-выделяющая активность препаратов ФС2 снижается до ~ 30% [Ловягина, Семин, 2017], а при рН 4,0 исчезает полностью [Schiller, Dau, 2000].



**Рис. 1. pH-зависимости скорости выделения кислорода нативными препаратами ФС2.**

—о— ФС2 инкубировали в буфере с заданным рН в течение 15 мин при 22 °С в темноте, затем переводили в буфер с рН 6,5 посредством центрифугирования;

—Δ— ФС2 инкубировали в буфере с заданным рН при тех же условиях, затем переводили в буфер с рН 6,5 путем пятикратного разбавления;

—□— ФС2 инкубировали в буфере с заданным рН при тех же условиях, затем переводили в буфер с рН 6,5 посредством центрифугирования и инкубировали 10 мин с 30 мМ CaCl<sub>2</sub>. Все измерения проводили в буфере с рН 6,5. 100% равно 500 мкМ O<sub>2</sub>/мг хл. в час.

В то же время зависимость скорости выделения кислорода от рН, измеренная другим способом (см. материалы и методы), когда после инкубации в среде с исследуемым рН препараты ФС2 переносят в буфер с рН 6,5 с помощью центрифугирования и выполняют все измерения в этом буфере, претерпевает некоторые изменения (рис. 1, кривая —о—). В области кислых рН скорость выделения кислорода по-прежнему снижается, но не так критично. После инкубации при рН 4,0 препараты ФС2 сохраняют до ~ 30% своей максимальной способности к выделению кислорода, и даже после инкубации при рН 3,0 активность не ингибируется полностью (остаточная активность составляет ~10%).

Следует отметить, что эффект рН, измеряемый непосредственно в буфере обработки, определяется как обратимыми, так и необратимыми изменениями в структуре кислород-выделяющего комплекса ФС2. Если же после инкубации в буфере с исследуемым рН препарат возвращается в буфер с оптимальным рН путем переосаждения, то измеряется эффект только необратимых изменений, индуцируемых рН. Скорость выделения кислорода препаратами ФС2, измеренная обоими способами, при понижении рН буфера ингибируется сходным образом, что позволяет заключить, что в области кислых рН происходит преимущественно необратимая инактивация КВК.

Можно предположить, что инактивация КВК в кислых средах связана с диссоциацией белков, формирующих КВК. Действительно, рК периферических белков PsbP, PsbQ и Mn-стабилизирующего белка PsbO равны, соответственно, 5,0, 4,1 и 3,6 [Shen, Inoue, 1991]. Кроме того, известно, что обработка препаратов ФС2 кислой средой

приводит к удалению катиона  $\text{Ca}^{2+}$  из КВК [Ono, Inoue, 1988]. Для выяснения механизма обратимого снижения кислород-выделяющей активности препаратов ФС2 при кислых рН мы исследовали эффект рН среды на скорость выделения кислорода ФС2 следующим образом. Препараты ФС2 инкубировали в буфере с исследуемым рН в течение 15 мин при комнатной температуре при концентрации хлорофилла 50 мкг/мл, затем быстро охлаждали во льду и разбавляли буфером с рН 6,5 в 5 раз, после чего выполняли измерения скорости выделения кислорода при оптимальном рН 6,4–6,5. Такая постановка эксперимента позволила нам изменить рН среды на оптимальное без центрифугирования и удаления предположительно диссоциировавших в кислой среде белков КВК. Результаты, представленные на рис. 1 (кривая  $-\Delta-$ ), показывают, что активность ФС2, измеренная таким способом, существенно увеличивается в интервале рН 3,5–5,0. Максимальное восстановление активности (более чем на 30%) наблюдается при рН 4,5. Эти данные свидетельствуют, что при кислых рН происходит диссоциация двух периферических белков PsbP, PsbQ, которые при переводе препаратов в буфер с рН 6,4–6,5 способны вновь связаться с донорной стороной ФС2. Отрыв этих белков обычно сопровождается удалением катиона Ca из КВК, и добавление экзогенного кальция к препаратам, обработанным кислыми рН и переведенными в среду с рН 6,5 с помощью центрифугирования, тоже должно приводить к восстановлению кислород-выделяющей активности ФС2. Действительно, результаты, приведенные на рис. 1 (кривая  $-\square-$ ), демонстрируют восстановление активности ФС2 после обработки кислым рН и центрифугирования при измерении скорости выделения кислорода на фоне 30 мМ экзогенного добавленного  $\text{CaCl}_2$ .

Таким образом, полученные результаты прямо показывают, что при обработке препаратов ФС2 средой с кислыми рН наряду с необратимыми нарушениями происходит обратимая диссоциация двух периферических белков PsbP и PsbQ и экстракция катиона  $\text{Ca}^{2+}$  из КВК. Обратимая часть деструкции КВК может быть устранена путем изменения рН среды инкубации препаратов ФС2 на оптимальное (рН 6,4–6,5) в присутствии диссоциировавших периферических белков, либо путем добавления экзогенного  $\text{Ca}^{2+}$  при оптимальных рН.

#### Литература

Ловягина Е.Р., Семин Б.К. рН-зависимые обратимые и необратимые изменения в кислород-выделяющем комплексе фотосистемы 2 // Актуальные вопросы биологической физики и химии. – 2017. – Т. 2, № 1. – С. 44–48.

Bernat G., Morvaridi F., Feyziyev Y., Styring S. pH dependence of the four individual transitions in the catalytic S-cycle during photosynthetic oxygen evolution // Biochemistry. – 2002. – V. 41, No. 18. – P. 5830–5843.

Damoder R., Dismukes G.C. pH dependence of the multiline, manganese EPR signal for the 'S2' state in PS II particles // FEBS Lett. – 1984. – V. 174. – P. 157–161.

Ghanotakis D.F., Babcock G.T., Yocum C.F. Calcium reconstitutes high rates of oxygen evolution in polypeptide depleted photosystem II preparations // FEBS Lett. – 1984. – V. 167. – P. 127–130.

Haddy A., Hatchell J.A., Kimel R.A., Thomas R. Azide as a competitor of chloride in oxygen evolution by photosystem II // Biochemistry. – 1999. – V. 38. – P. 6104–6110.

Krieger A., Weis W. Energy-dependent quenching of chlorophyll-a-fluorescence: the involvement of proton-calcium exchange at photosystem II // Photosynthetica. – 1992. – V. 27. – P. 89–98.

Ono T., Inoue Y. Discrete extraction of the Ca atom functional for  $\text{O}_2$  evolution in higher plant photosystem II by a simple low pH treatment // FEBS Lett. – 1988. – V. 227. – P. 147–152.

Schiller H., Dau H. Preparation protocols for high-activity photosystem II membrane particles of green algae and higher plants, pH dependence of oxygen evolution and comparison of the S<sub>2</sub>-state multiline signal by X-band EPR spectroscopy // J. Photochem. Photobiol. B: Biol. – 2000. – V. 55. – P. 138–144.

Semin B.K., Davletshina L.N., Aleksandrov A.Yu., Lanchinskaya V.Yu., Novakova A.A., Ivanov I.I. pH dependence of the efficiency of binding of iron cations to the donor side of photosystem II // Biochemistry (Moscow). – 2004. – V. 69, No. 3. – P. 331–339.

Shen J.R., Inoue Y. Low pH-induced dissociation of three extrinsic proteins from O<sub>2</sub>-evolving Photosystem II // Plant Cell Physiol. – 1991. – V. 32, No. 3. – P. 453–457.

Vass I., Styring S. pH-dependent charge equilibria between tyrosine-D and the S states in photosystem II. Estimation of relative midpoint redox potentials // Biochemistry. – 1991. – V. 30, No 3. – P. 830–839.

## **MECHANISM OF PHOTOSYSTEM II OXYGEN EVOLUTION ACTIVITY DECREASE AT ACIDIC pH**

E.R. Lovyagina, B.K. Semin

Federal State Budget Educational Institution of Higher Education M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia, *Elena.Lovyagina@gmail.com*

**Abstract.** The mechanism of acid pH inhibition effect on the activity of oxygen-evolving complex (OEC) of photosystem II (PSII) membranes preparations was investigated in the presented study. Obtained results demonstrate that incubation of PSII preparations in acid buffer with pH 3.5 – 5.0 provide irreversible dissociation of two extrinsic proteins PsbP and PsbQ and extraction of Ca<sup>2+</sup> from the OEC that is accompanied by significant inhibition of OEC efficiency. Activity of OEC can be restored either by the adjusting of pH incubation medium to optimum values (pH 6.4 – 6.5) in the presence of extrinsic proteins PsbP and PsbQ or by addition of exogenous Ca<sup>2+</sup> cation at optimal pH.

**Keywords:** *photosystem II, oxygen-evolving complex, pH*