

ИНГИБИРОВАНИЕ ЭЛЕКТРОН-ТРАНСПОРТНОЙ ЦЕПИ ФОТОСИСТЕМЫ 2 КАТИОНАМИ ТЕРБИЯ

Локтюшкин А.В., Ловягина Е.Р., Семин Б.К.

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова
ул. Ленинские горы, 1, стр. 12, г. Москва, 119234, РФ; e-mail: Elena.Lovyagina@gmail.com

Поступила в редакцию: 29.06.2018

Аннотация. Светозависимое окисление воды и выделение молекулярного кислорода в окисленных организмах осуществляется кислород-выделяющим комплексом (КВК) фотосистемы 2 (ФС2). Каталитическим центром КВК является кластер Mn_4CaO_5 , структура которого в настоящее время расшифрована. Присутствие катионов кальция обязательно для функционирования КВК, и их удаление при сохранении катионов марганца в каталитическом центре приводит к ингибированию функции выделения кислорода. Однако механизм участия Ca^{2+} в функционировании КВК до сих пор не установлен. Известно, что некоторые ионы редкоземельных элементов имеют сходные с ионами кальция физико-химические свойства и взаимодействуют с Ca^{2+} -связывающими белками. Такое связывание либо ингибирует функциональную активность белка, либо может частично восстанавливать её в отсутствие Ca^{2+} . В настоящей работе исследовано влияние одного из редкоземельных элементов (тербия) на скорость электронного транспорта в мембранных препаратах ФС2. Основной акцент сделан на сопоставлении влияния катионов тербия на функцию выделения кислорода и транспорт электронов через ФС2 к искусственному акцептору. Обнаружено, что Tb^{3+} ингибирует выделение кислорода более эффективно, чем восстановление искусственного акцептора электронов 2,6-дихлорофенолиндофенола на акцепторной стороне ФС2, то есть его действие приводит к разобщению этих процессов. Аналогичный эффект наблюдается при экстракции катионов кальция из КВК [Semin et al. Photosynth. Res. 98 (2008) 235]. Предполагается, что ингибирующий эффект катионов тербия связан с замещением Ca^{2+} и/или вытеснением периферических белков PsbP и PsbQ из ФС2.

Ключевые слова: фотосистема 2, тербий, кальций, кислород-выделяющий комплекс.

ВВЕДЕНИЕ

Появление на Земле примерно 2,4 млрд лет назад кислородного фотосинтеза привело к масштабным перестройкам биосферы. Вероятно, накопление в атмосфере кислорода – побочного продукта окислительного фотосинтеза – открыло возможности для появления эукариотической клетки и многоклеточных растений и животных [1]. Светозависимое окисление воды, выделение молекулярного кислорода и восстановление пула хинонных акцепторов электронов осуществляет фотосистема 2 (ФС2) – пигмент-белковый комплекс, обнаруженный у цианобактерий, различных групп водорослей и высших растений. ФС2 содержит кислород-выделяющий комплекс (КВК), в состав которого входят 4 иона марганца, ион кальция и один или два иона хлора [2]. Установлено, что катионы кальция необходимы для функционирования КВК, так как их удаление при сохранении катионов марганца и Mn-стабилизирующего белка ингибирует светозависимое выделение кислорода [3]. Однако механизм участия Ca^{2+} в функционировании КВК до сих пор не установлен. Высказывались предположения, что ионы кальция принимают участие в связывании окисляемых молекул воды или модифицируют окислительно-восстановительный потенциал КВК [4].

Показано, что ингибиторы Ca^{2+} -связывающего регуляторного белка кальмодулина и ингибиторы кальциевых каналов могут снижать скорость транспорта электронов в ФС2 [5, 6]. Кроме того, аналогичными свойствами обладают ионы металлов – антагонисты ионов Ca^{2+} , например, Al^{3+} и Cd^{2+} [5]. Известно, что некоторые ионы редкоземельных элементов имеют сходные с ионами кальция физико-химические свойства, в частности, радиус и координационное число, и взаимодействуют с Ca^{2+} -связывающими белками. Такое связывание либо ингибирует функциональную активность белка, либо может частично восстанавливать её в отсутствие Ca^{2+} [7]. В работе Оно [8] изучалось взаимодействие некоторых лантаноидов с Ca^{2+} -связывающим участком ФС2. Полученные результаты позволили автору высказать предположение, что лантаноиды ингибируют активность КВК по смешанному типу, имея собственные участки связывания и конкурируя с Ca за связывание с Ca^{2+} -связывающим участком, причем сродство к нему уменьшается с увеличением радиуса металла. В настоящей работе исследовалось влияние одного из малоизученных ионов редкоземельных элементов тербия Tb^{3+} на скорость электронного транспорта в мембранных препаратах ФС2.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Частицы ФС2 с активным КВК получали путем солубилизации тилакоидных мембран рыночного шпината *Spinacia oleracea* L. детергентом Тритон X-100 согласно методике [9]. Все измерения проводили в буфере А, содержащем 400 мМ сахарозу, 15 мМ NaCl, 50 мМ Mes (2-(*N*-морфолино)этансульфовую кислоту), pH 6,5. Функциональную активность частиц ФС2 оценивали по скорости восстановления искусственного акцептора электронов 2,6-дихлорофенолиндофенола (ДХФИФ) и скорости выделения кислорода при фотоокислении воды в присутствии акцептора 2,6-дихлоро-*n*-бензохинона (ДХБХ). Концентрации акцепторов составляли 40 мкМ ДХФИФ и 200 мкМ ДХБХ. Кинетику фотоиндуцированного восстановления ДХФИФ регистрировали фотометрически на спектрофотометре Specord UV-VIS (Германия) при длине волны 600 нм. В расчетах использовали коэффициент молярной экстинкции для депротонированной окисленной формы ДХФИФ, равный $21800 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ [10]. Кинетику фотоиндуцированного выделения кислорода регистрировали амперометрически с помощью полярографа LP-7e (Laboratomi Pstroje, Чешская Республика) и закрытого электрода Кларка в термостатируемой ячейке при температуре 25 °С. Для калибровки диффузионного тока использовали значение концентрации кислорода в воде в равновесии с воздухом при 25 °С и атмосферном давлении, равное 253 мкМ. Источниками возбуждающего света были светодиоды XBDR0Y (Cree Inc., США) с максимумом испускания 450 нм. Кривые индукции флуоресценции (КИФ) измеряли с помощью портативного прибора Plant Efficiency Analyzer (Hansatech Instruments Ltd., Великобритания). Источником света служил светодиод с максимумом излучения 650 нм (спектральный диапазон 580-710 нм). Суммарную концентрацию хлорофиллов *a* и *b* определяли согласно [11]; при всех измерениях она составляла 10 мкг/мл. Для удаления ионов марганца частицы ФС2 инкубировали в течение 15 минут в буфере с pH 8,5, содержащем 0,8 мМ Tris (трис(гидроксиметил)аминометан), при комнатном освещении (концентрация хлорофилла 500 мкг/мл). Далее препараты осаждали центрифугированием (3 мин, $16100 \times g$) и ресуспендировали в буфере А. Процедуру отмывки повторяли 3 раза. Tb^{3+} добавляли к частицам ФС2 в виде раствора сульфата металла в буфере А. Перед измерениями препараты инкубировали с Tb^{3+} при комнатном освещении и температуре 25 °С в течение 5 мин.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе проведено сравнительное исследование электрон-транспортной функции и способности к выделению кислорода ФС2 в присутствии ионов тербия. Результаты влияния Tb^{3+} на скорость восстановления ДХФИФ и выделения кислорода ФС2 мембранами представлены на рисунке 1 и 2.

На рисунке 1А приведены типичные кинетические кривые светоиндуцированного изменения оптической плотности искусственного акцептора электронов ДХФИФ при 600 нм в присутствии контрольных препаратов ФС2 и препаратов ФС2 с 2 мМ Tb^{3+} в среде инкубации. Снижение оптической плотности обусловлено восстановлением ДХФИФ с образованием бесцветного продукта. Типичные кривые выделения кислорода частицами ФС2 приведены на рисунке 1Б. Оба процесса были практически линейными в течение как минимум 15 с после включения возбуждающего света для препаратов ФС2 как в отсутствие ионов Tb^{3+} , так и в их присутствии при всех использованных концентрациях (50 мкМ-2 мМ).

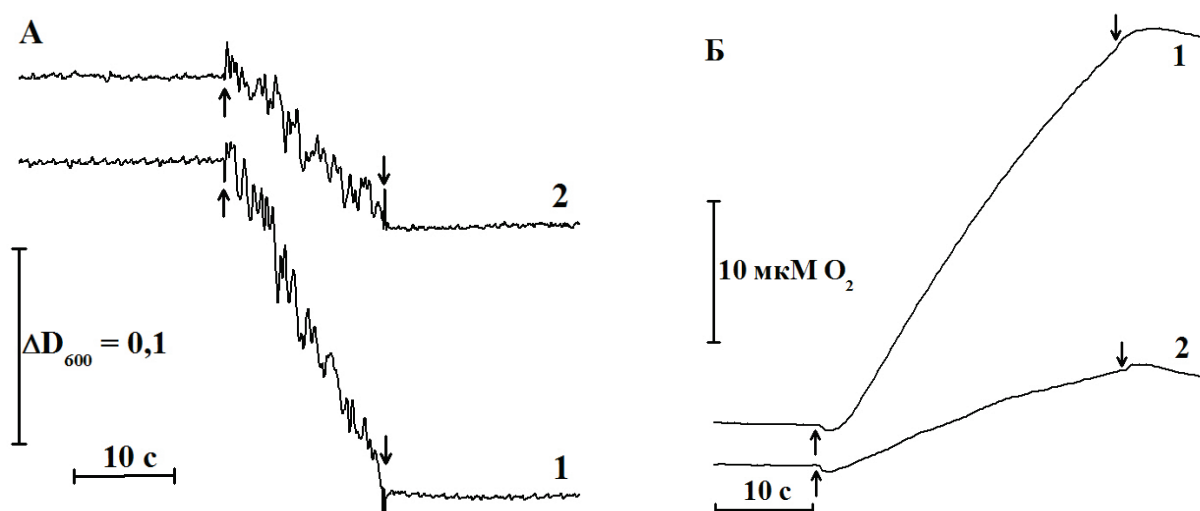


Рисунок 1. Кинетические кривые фотоиндуцированного восстановления ДХФИФ (А) и выделения O_2 (Б) мембранными препаратами ФС2 в отсутствие Tb^{3+} (1) и в присутствии 2 мМ Tb^{3+} . Стрелками обозначены моменты включения (\uparrow) и выключения (\downarrow) возбуждающего света

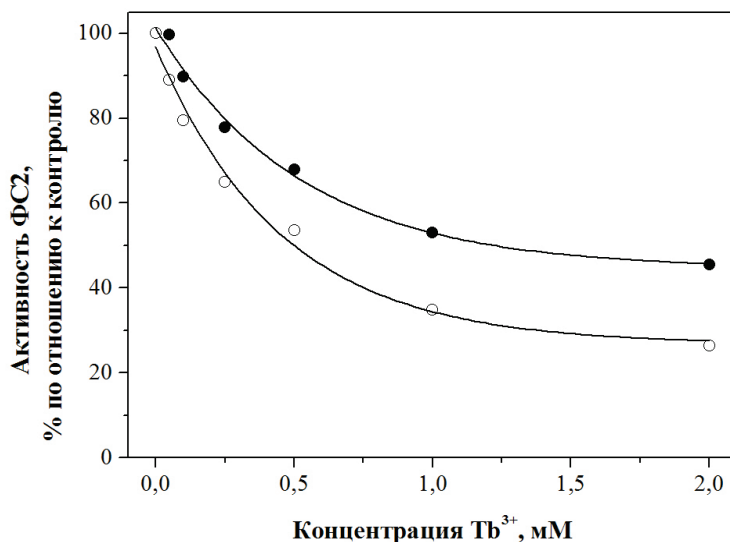


Рисунок 2. Влияние Tb^{3+} на скорость восстановления ДХФИФ (-●-) и выделения кислорода (-○-) частицами ФС2. 100 % соответствует скорости восстановления ДХФИФ 180 мкмоль/мг хлорофилла в час и скорости выделения O_2 450 мкмоль/мг хлорофилла в час

Зависимости активности ФС2 от концентрации Tb^{3+} , рассчитанные по скоростям восстановления ДХФИФ и выделения кислорода, приведены на рисунке 2. В присутствии Tb^{3+} снижалась как скорость восстановления ДХФИФ, так и скорость выделения O_2 на свету. Полученные нами результаты в целом согласуются с данными, приведенными в работах [5] и [12]. Однако следует отметить, что ингибирующий эффект тербия на фотоиндуцированное восстановление ДХФИФ выражен заметно слабее, чем на выделение O_2 . В частности, при максимальной использованной концентрации Tb^{3+} 2 мМ скорость выделения кислорода препаратами ФС2 снижается до 26 % от контрольного уровня, а скорость донирования электронов на ДХФИФ лишь до 45 %. Ранее подобный эффект значительного ингибирования светозависимого выделения кислорода при сохранении способности поставлять электроны в электрон-транспортную цепь был выявлен в препаратах ФС2, из которых были удалены ионы Ca^{2+} путем обработки 2 М NaCl в отсутствие экзогенных хелаторов [13]. Этот феномен, названный «эффектом разобщения», был обнаружен позднее и при обработке ФС2 ионами F^- , CH_3COO^- и NH_4^+ [14].

Однако обнаруженный нами эффект различия в эффективности ингибирования светозависимого восстановления ДХФИФ и выделения кислорода ФС2 в присутствии Tb^{3+} может быть связан с тем, что при определении активности двумя различными методами использовались разные электронные акцепторы (ДХФИФ и ДХБХ). Чтобы исключить эту возможность, мы исследовали влияние тербия на КИФ препаратов ФС2 и сравнили полученные кривые с КИФ ФС2 в присутствии 3-(3,4-дихлорофенил)-1,1-диметилмочевин (диурона – блокатора переноса электрона с первичного хинонного акцептора Q_A на вторичный хинонный акцептор Q_B) и КИФ ФС2, из которой удалены ионы марганца обработкой $TiCl_3$ -буфером в щелочной среде (ФС2(-Mn)). Важно отметить, что регистрация КИФ позволяет исследовать транспорт электронов на донорной и акцепторной стороне ФС2 в отсутствие экзогенных акцепторов. Полученные кривые приведены на рисунке 3.

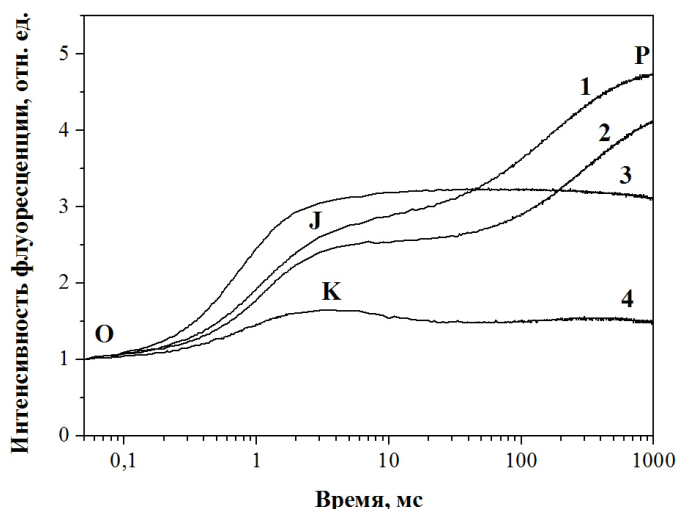


Рисунок 3. Кривые индукции флуоресценции различных препаратов ФС2: 1 – контроль (ФС2 без добавок); 2 – ФС2 в присутствии 2 мМ Tb^{3+} ; 3 – ФС2 в присутствии 40 мкМ диурона; 4 – ФС2(-Mn) без добавок

Построенная в полулогарифмических координатах КИФ нативной ФС2 (кривая 1, рис. 3) характеризуется наличием двух участков – О-И и И-Р. Участок О-И соответствует восстановлению первичного пластохинона Q_A , а участок И-Р – восстановлению вторичного пластохинона Q_B [15]. В присутствии диурона (кривая 3, рис. 3) флуоресценция монотонно возрастает и достигает максимума, соответствующего восстановлению только первичного акцептора Q_A . КИФ ФС2(-Mn) (кривая 4) характеризуется изначальным незначительным возрастанием интенсивности флуоресценции и достижением максимума К с последующим её падением. Пик К соответствует восстановлению Q_A на свету, дальнейшее падение интенсивности флуоресценции связано с окислением Q_A вторичным акцептором Q_B при отсутствии потока электронов со стороны КВК [16]. КИФ ФС2 в присутствии Tb^{3+} (кривая 2, рис. 3) по форме сходна с КИФ нативной ФС2: участок кривой И-Р сохраняется, хотя и характеризуется более медленным нарастанием интенсивности флуоресценции. При этом форма КИФ в присутствии тербия существенно отличается от формы КИФ препаратов ФС2 в присутствии диурона (заблокирован электронный транспорт на акцепторной стороне) и КИФ препаратов ФС2(-Mn) (заблокирован электронный транспорт на донорной стороне). Эти результаты позволяют сделать вывод о том, что в частицах ФС2, обработанных Tb^{3+} , электронный транспорт сохраняется и в отсутствие экзогенного акцептора.

Таким образом, можно заключить, что в присутствии ионов Tb^{3+} выделение O_2 частицами ФС2 ингибируется более эффективно, чем электронный транспорт, то есть наблюдается разобщение этих процессов. Этот эффект может быть связан с ингибированием функции Ca^{2+} в КВК, приводящим к нарушению функционирования S-цикла. Хотя природа донора электронов в частицах ФС2, обработанных тербием, к настоящему моменту неясна, можно предположить, что им является вода, которая в данном случае окисляется до пероксида водорода H_2O_2 или других продуктов неполного восстановления молекулярного кислорода [17].

Список литературы / References:

1. Lane N., Martin W. The energetics of genome complexity. *Nature*, 2010, vol. 467, pp. 929-934.
2. Umena Y., Kawakami K., Shen J.-R., Kamiya N. Crystal structure of oxygen evolving photosystem II at a resolution of 1.9 Å. *Nature*, 2011, vol. 473, pp. 55-60.
3. 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, vol. 167, pp. 127-130.
4. McEvoy J.P., Brudvig G.W. Water-splitting chemistry of photosystem II. *Chemical reviews*, 2006, vol. 106, pp. 4455-4483.
5. Nakatani H.Y. Inhibition of photosynthetic oxygen evolution by calmodulin-type inhibitors and other calcium-antagonists. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1984, vol. 121, pp. 626-633.
6. Carpentier R., Nakatani H.Y. Inhibitors affecting the oxidizing side of Photosystem II at the Ca^{2+} -and Cl⁻-sensitive sites. *Biochim. Biophys. Acta*, 1985, vol. 808, pp. 288-292.
7. Evans C.H. *Biochemistry of the Lanthanides*. N.-Y.: Springer Science & Business Media, 1990, 444 p.
8. Ono T. Effects of lanthanide substitution at Ca^{2+} -site on the properties of the oxygen evolving center of photosystem II. *J. Inorg. Biochem.*, 2000, vol. 82, pp. 85-91.
9. Ghanotakis D.F., Babcock G.T. Hydroxylamine as an inhibitor between Z and P680 in photosystem II. *FEBS Lett.*, 1983, vol. 153, pp. 231-234.
10. Armstrong J.M. The molar extinction coefficient of 2,6-dichlorophenolindophenol. *Biochim. Biophys. Acta*, 1964, vol. 86, pp. 194-197.
11. Porra R.J., Thompson W.A., Kriedemann P.E. 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*, 1989, vol. 975, pp. 384-394.
12. Popovic R., Carpentier R., Morin L. Determination of fluorescence inductions in a PSII submembrane fraction affected by additives. *J. Plant Physiol.*, 1988, vol. 132, pp. 754-757.
13. Semin B.K., Davletshina L.N., Ivanov I.I., Rubin A.B., Seibert M. Decoupling of the processes of molecular oxygen synthesis and electron transport in Ca^{2+} -depleted PSII membranes. *Photosynth. Res.*, 2008, vol. 98, pp. 235-249.
14. Lovyagina E.R., Semin B.K. Mechanism of inhibition and decoupling of oxygen evolution from electron transfer in photosystem II by fluoride, ammonia and acetate. *J. Photochem. Photobiol., B: Biology*, 2016, vol. 158, pp. 145-153.
15. Pospíšil P., Dau H. Chlorophyll fluorescence transients of photosystem II membrane particles as a tool for studying photosynthetic oxygen evolution. *Photosynth. Res.*, 2000, vol. 65, pp. 41-52.
16. Strasser B.J. Donor side capacity of photosystem II probed by chlorophyll a fluorescence transients. *Photosynth. Res.*, 1997, vol. 52, pp. 147-155.
17. Semin B.K., Davletshina L.N., Timofeev K.N., Ivanov I.I., Rubin A.B., Seibert M. Production of reactive oxygen species in decoupled, Ca^{2+} -depleted PSII and their use in assigning a function to chloride on both sides of PSII. *Photosynth. Res.*, 2013, vol. 117, pp. 385-399.

INHIBITION OF PHOTOSYSTEM II ELECTRON-TRANSPORT CHAIN BY TERBIUM IONS

Loktyushkin A.V., Lovyagina E.R., Semin B.K.

M.V.Lomonosov Moscow State University

Leninskie gory str., 1, building 12, Moscow, 119234, Russia; e-mail: Elena.Lovyagina@gmail.com

Abstract. Light-dependent water oxidation and evolution of molecular oxygen in the oxygenic organisms is performed by oxygen-evolving complex (OEC) of photosystem II (PSII). Catalytic center of the OEC is the Mn_4CaO_5 cluster the structure of which is determined now. The presence of calcium cation in the OEC is necessary for OEC function and extraction of this cation from the OEC without depletion of Mn cations inhibits the oxygen evolution reaction. However, the mechanism of Ca^{2+} participation in the water splitting by OEC is unclear now. It is known that the ions of rare-earth metals have similar physical and chemical properties with Ca^{2+} ions and interact with Ca^{2+} -binding proteins. Possibly such interaction could either inhibit the protein function in the absence of Ca^{2+} or could partially reduce its function in the absence of Ca^{2+} . In the present study it was investigated the effect of the one of rare-earth metals – terbium – on the electron-transport rate in the membrane preparations of PSII. The focus of attention in our study was the correlation between the terbium effect on the oxygen evolution reaction and the electron transport to artificial electron acceptor. We found that Tb^{3+} inhibits the oxygen evolution more effectively than reduction of the artificial electron acceptor 2,6-dichlorophenolindophenol on the acceptor side of PSII that is terbium action provides the decoupling of these processes. Similar effect is observed in Ca-depleted PSII membranes [Semin et al. *Photosynth. Res.* 98 (2008) 235]. Taking these results into account we suppose that terbium inhibition effect is determined by its substitution of Ca^{2+} cation in the OEC and/or extraction of extrinsic proteins PsbP and PsbQ.

Key words: *photosystem II, terbium, calcium, oxygen-evolving complex.*