

**РАЗОБЩЕНИЕ ФУНКЦИИ ВЫДЕЛЕНИЯ КИСЛОРОДА И ЭЛЕКТРОННОГО ТРАНСПОРТА В ФОТОСИСТЕМЕ 2 АММОНИЕМ**

Ловягина Е.Р., Белевич Н.П., Семин Б.К.

Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова

*Ленинские горы, 1, стр. 12, г. Москва, 119234, РФ**e-mail: Elena.Lovyagina@gmail.com*

**Аннотация.** Каталитическим центром кислород-выделяющего комплекса (КВК) фотосистемы 2 (ФС2) является кластер  $Mn_4CaO_5$ , структура которого в настоящее время расшифрована. Экстракция катионов кальция из КВК приводит к разобщению функции выделения молекулярного кислорода и электронного транспорта через ФС2 [Semin et al. *Photosynth. Res.* 98 (2008) 235] и одновременному появлению уширенного ЭПР сигнала с  $g = 2$  (расщепленный «S3» сигнал). Не исключено, что это взаимосвязанные эффекты. Однако ЭПР сигнал «S3» наблюдается не только при удалении  $Ca^{2+}$  из КВК, но и после обработки нативных мембранных препаратов ФС2 анионами фтора, ацетата и хлоридом аммония. Ранее мы установили, что анионы фтора, подобно экстракции  $Ca^{2+}$ , разобщают электрон-транспортные процессы и выделение кислорода. В представленной работе изучено действие хлорида и нитрата аммония на функциональную активность мембранных препаратов ФС2 с нативным КВК. Обнаружено, что как хлорид, так и нитрат аммония ингибирует выделение кислорода более эффективно, чем восстановление искусственного акцептора электронов 2,6-дихлорфенолиндофенола на акцепторной стороне ФС2, то есть действие аммония приводит к разобщению этих процессов. Предполагается, что ингибирующий эффект аммония связан с инактивацией функции  $Ca^{2+}$ .

**Ключевые слова:** фотосистема 2, кислород-выделяющий комплекс, аммоний.

**INHIBITION OF PHOTOSYSTEM II ELECTRON-TRANSPORT CHAIN BY AMMONIA AND “DECOUPLING EFFECT”**

Lovyagina E.R., Belevich N.P., Semin B.K.

Moscow State University

*Leninskie gori, 1, building 12, Moscow, 119234, Russia**e-mail: Elena.Lovyagina@gmail.com*

**Abstract.** Catalytic center of oxygen-evolving complex (OEC) of photosystem II (PSII) is  $Mn_4CaO_5$  cluster structure of which is determined now.  $Ca^{2+}$  extraction from OEC is accompanied by decoupling of oxygen evolution and electron transport processes in PSII and by the appearance of a broad EPR signal (so-called “S3” or “split signal”) at low temperatures. These data imply that decoupling and EPR effects can be interdependent. It is interesting that EPR signal «S3» is observed also after treatment of native PSII membranes by fluoride anions, acetate and chloride of ammonia. Previously we found that fluoride anions treatment of PSII like  $Ca^{2+}$  extraction from the OEC provide the appearance of decoupling effect. In the presented work we investigated the effect of ammonia chloride and ammonia nitrate on the functional activity of native PSII membranes to study the effect of anions. We found that ammonia nitrate like ammonia chloride inhibit the oxygen evolution more effectively than the reduction of artificial electron acceptor 2,6-dichlorophenolindophenol that is the action of ammonia decouples these processes. However the inhibition doesn't depend on the anions. We suggest that ammonia inhibition effect is determined by inactivation of  $Ca^{2+}$  function.

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

Каталитический центр кислород-выделяющего комплекса (КВК) фотосистемы 2 (ФС2) высших растений, зеленых водорослей и цианобактерий, осуществляющий окисление воды и синтез молекулярного кислорода, состоит из 4 катионов марганца и одного катиона кальция, соединенных между собой 5 атомами кислорода [1-3]. Катион  $Ca^{2+}$  может быть удален из КВК обработкой ФС2 мембран 1-2 М раствором NaCl или цитратным буфером с низким pH. При этом вначале удаляются внешние белки КВК PsbP и PsbQ, что ведет к экстракции катиона кальция [4]. Хотя препараты ФС2 без Ca (ФС2(-Ca)) все еще содержат  $Mn_4$ -кластер, они не способны выделять молекулярный кислород [4]. Однако если удалить Ca в отсутствие экзогенных хелаторов, то такие препараты сохраняют способность окислять воду, по-прежнему поставляя электроны в электрон-транспортную цепь к акцепторной стороне ФС2. Этот феномен был назван «эффектом разобщения» [5]. Светоиндуцированный электронный транспорт в ФС2(-Ca) является следствием неполного окисления молекул воды до промежуточного продукта – перекиси водорода [6].

Удаление катиона  $Ca^{2+}$  из КВК сопровождается также появлением уширенного ЭПР-сигнала («S3» или расщепленного сигнала), являющегося результатом взаимодействия радикала  $Y_2$  с катионами марганца [7-10]. Поскольку удаление Ca приводит к возникновению двух вышеупомянутых явлений – эффекта разобщения и появления специфического «S3» сигнала ЭПР, можно предположить, что между ними существует прямая связь. Необходимо отметить, что появление сигнала «S3» может быть связано не только с удалением Ca из КВК, но и с обработкой препаратов ФС2 ингибиторами КВК – анионами фтора [11], ацетатом натрия [12, 13], хлоридом аммония [10]. В настоящей работе мы исследовали влияние аммония на соотношение скоростей электронного транспорта и выделения кислорода мембранными препаратами ФС2, чтобы подтвердить или опровергнуть взаимосвязь ЭПР сигнала «S3» и эффекта разобщения.

Исследования проводили на препаратах ФС2 с активным КВК, которые выделяли из шпината согласно методике [14]. Функциональные и спектральные характеристики использованных препаратов соответствовали опубликованным ранее [14, 15]. Препараты хранили в жидком азоте в буфере А, содержащем 15 мМ NaCl, 400 мМ сахарозу и 50 мМ Mes-NaOH (рН 6,5). В этом буфере проводили и все эксперименты. Скорость выделения кислорода измеряли амперометрически с помощью закрытого платинового электрода Кларка при 25 °С. В качестве акцептора электронов использовали 2,6-дихлор-*n*-бензохинон (0,2 мМ). Концентрация хлорофилла во всех образцах была равна 10 мкг/мл. Скорость электронного транспорта измеряли спектрофотометрически как скорость восстановления экзогенного акцептора электронов 2,6-дихлорфенолиндофенола (ДХФИФ). Концентрации хлорофилла и ДХФИФ составляли 20 мкг/мл и 40 мкМ, соответственно. В расчетах использовали молярный коэффициент поглощения для депротонированной формы ДХФИФ при 600 нм, равный 21,8 мМ<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup>.

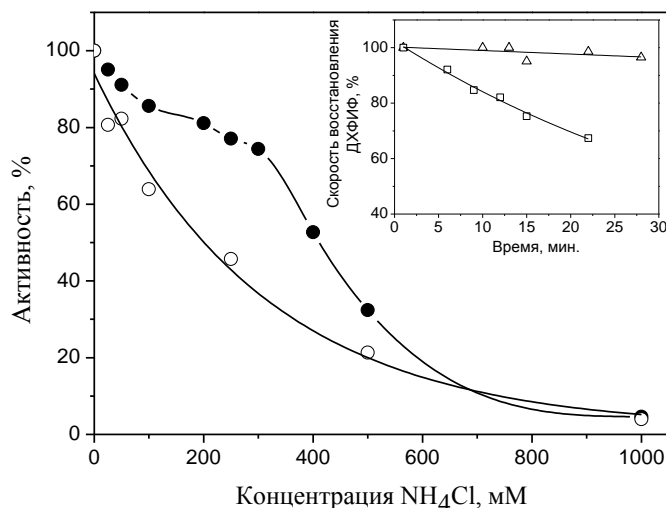


Рисунок 1 – Влияние хлорида аммония на скорости выделения кислорода (○) и восстановления ДХФИФ (●) нативными препаратами ФС2. Образцы инкубировали с NH<sub>4</sub>Cl в течение 5 мин. при 25°С в темноте. 100% соответствуют скорости выделения O<sub>2</sub> 450 – 550 мкмоль/мг хл. в час и скорости восстановления ДХФИФ 140 – 150 мкмоль/мг хл. в час. Врезка: временные зависимости скорости восстановления ДХФИФ нативными препаратами ФС2 в буфере А с 250 мМ NH<sub>4</sub>Cl: (□) – инкубация препаратов с NH<sub>4</sub>Cl при 25°С в темноте; (Δ) – инкубация препаратов с NH<sub>4</sub>Cl при 4°С с последующим прогревом при 25°С 5 мин. в темноте

В настоящей работе мы исследовали проблему: может ли NH<sub>4</sub>Cl, который подобно экстракции катионов Ca<sup>2+</sup> индуцирует появление расщепленного ЭПР сигнала в препаратах ФС2, разобщать электрон-транспортную функцию и выделение кислорода ФС2. Результаты влияния хлорида аммония на скорость восстановления ДХФИФ и выделения кислорода ФС2 мембранами представлены на рисунке 1. Для корректного сопоставления данных, полученных полярографическим методом и абсорбционной спектрофотометрией, было подобрано оптимальное для обоих методов время инкубации препаратов ФС2 с NH<sub>4</sub>Cl. Для этого были сняты временные зависимости эффекта хлорида аммония на скорость восстановления ДХФИФ препаратами ФС2 (см. врезку на рис. 1). Инкубация препаратов с NH<sub>4</sub>Cl при 25°С приводит существенному снижению скорости электронного транспорта через ФС2. Однако инкубация препаратов с NH<sub>4</sub>Cl при 4 °С с последующим прогревом их до 25 °С (температура измерений скорости выделения кислорода) в течение 5 минут практически не влияет на скорость восстановления ДХФИФ. Этот режим был использован во всех последующих экспериментах, результаты которых представлены на рисунке 1. Из рисунка видно, что концентрационная зависимость ингибирования выделения кислорода NH<sub>4</sub>Cl хорошо описывается экспонентой и соответствует результатам, опубликованным ранее [16]. В то же время концентрационная зависимость ингибирования электронного транспорта к ДХФИФ носит более сложный характер. В интервале концентраций 100-300 мМ ингибирующий эффект NH<sub>4</sub>Cl незначителен, и в этом интервале мы наблюдали наиболее выраженный разобщающий эффект. Увеличение концентрации NH<sub>4</sub>Cl до 0,5 М приводило к уменьшению эффекта разобщения, а дальнейшее увеличение до 1 М – к полному исчезновению разобщения.

Эффект NH<sub>4</sub>Cl на КВК нативных препаратов ФС2 был изучен в ряде работ [16-21]. Однако в этих исследованиях были использованы маленькие (до 100 мМ) концентрации NH<sub>4</sub>Cl. Следует отметить, что применение больших концентраций NH<sub>4</sub>Cl может сопровождаться сопутствующим эффектом ионов Cl<sup>-</sup>, присутствующих в растворе вследствие диссоциации NH<sub>4</sub>Cl. Ранее было обнаружено, что анионы Cl<sup>-</sup> даже при относительно низких концентрациях (около 150 мМ) могут стимулировать удаление из КВК внешних белков PsbQ и PsbP, что приводит к ингибированию выделения кислорода [20]. Однако удаление этих белков наблюдалось только при освещении препаратов (достаточно интенсивности комнатного света) и длительной инкубации (40 мин). Чтобы исключить сопутствующий эффект анионов Cl<sup>-</sup>, мы исследовали влияние возрастающих

концентраций NaCl вплоть до 1М на выделение кислорода и восстановление ДХФИФ нативными мембранными препаратами ФС2 в условиях проведения экспериментов с  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , а именно после 5 минут инкубации при 25 °С в темноте. В этих условиях анионы  $\text{Cl}^-$  даже в концентрации 1 М слабо влияли на восстановление ДХФИФ и выделение кислорода (максимальное ингибирование составляет 15 % и 25 %, соответственно). Следовательно, основной вклад в ингибирующий эффект хлорида аммония вносят именно катионы  $\text{NH}_4^+$ .

Для исключения синергетического эффекта катионов  $\text{NH}_4^+$  и анионов  $\text{Cl}^-$  мы исследовали влияние на активность ФС2 другой соли аммония –  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ . На рисунке 2 представлены концентрационные зависимости влияния нитрата аммония на скорость восстановления ДХФИФ (электрон-транспортную активность) и скорость выделения кислорода мембранными препаратами ФС2. Видно, что кривая ингибирования электрон-транспортной активности многокомпонентна, тогда как концентрационная зависимость ингибирования выделения кислорода  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , как и в случае обработки препаратов  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , носит экспоненциальный характер. Ингибирующий эффект  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  незначителен в интервале меньших, чем в случае  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , концентраций (50-150 мМ), и в этом интервале мы наблюдали наиболее выраженный разобщающий эффект.

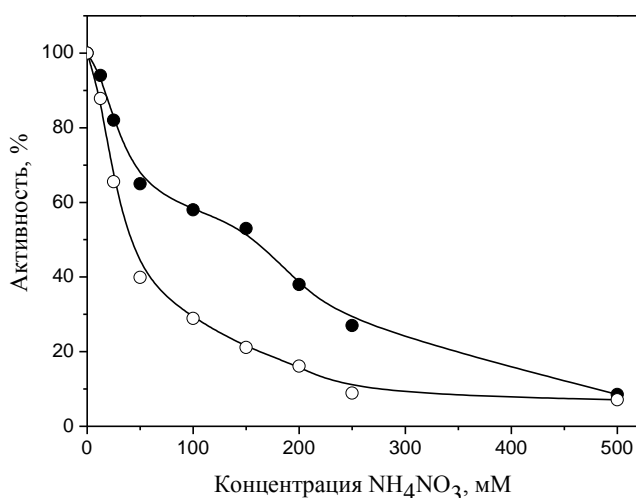


Рисунок 2 – Влияние нитрата аммония на скорости выделения кислорода (○) и восстановления ДХФИФ (●) нативными препаратами ФС2 (все условия как на рис. 1)

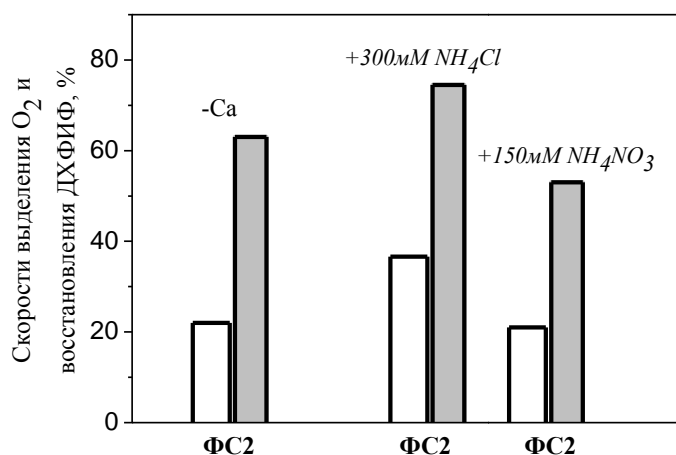


Рисунок 3 – Максимальные величины разобщающего эффекта (скорость восстановления ДХФИФ – серые столбцы; скорость выделения кислорода – белые столбцы) при удалении катионов  $\text{Ca}^{2+}$  из КВК и обработке нативных препаратов ФС2 хлоридом и нитратом аммония

На рисунке 3 показана максимальная разница в скоростях электронного транспорта и выделения кислорода при удалении ионов  $\text{Ca}^{2+}$  из КВК и обработке препаратов ФС2 хлоридом и нитратом аммония. Из рисунка видно, что максимальный разобщающий эффект (разность между скоростью восстановления ДХФИФ и выделения кислорода) равен 41% и наблюдается при экстракции ионов  $\text{Ca}^{2+}$ . Обработка ФС2 мембран солями аммония вызывает чуть меньший, но схожий по величине эффект разобщения. В случае обработки препаратов 300 мМ

$\text{NH}_4\text{Cl}$  он составляет 38%, а в случае обработки 150 мМ  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  – 32%. Таким образом, мы может заключить, что обработка ФС2 мембран аммонием (наряду с экстракцией ионов  $\text{Ca}^{2+}$  и обработкой анионами  $\text{F}^-$ ) приводит не только к возникновению «S3» ЭПР сигнала, но и разобщает электрон-транспортные процессы и выделение кислорода в ФС2.

#### Список литературы / References:

1. 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.
2. Suga M., Akita F., Hirata K., Ueno G., Murakami H., Nakajima Y., Shimizu T., Yamashita K., Yamamoto M., Ago H., Shen J.-R. Native structure of photosystem II at 1.95 Å resolution viewed by femtosecond X-ray pulses. *Nature*, 2015, vol. 517, pp. 99-103.
3. Cardona T., Murray J.W., Rutherford A.W. Origin and Evolution of Water Oxidation before the Last Common Ancestor of the Cyanobacteria. *Mol. Biol. Evol.*, 2015, vol. 32, pp. 1310-1328.
4. 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.
5. 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  $\text{Ca}^{2+}$ -depleted PSII membranes. *Photosynth. Res.*, 2008, vol. 98, pp. 235-249.
6. Semin B.K., Davletshina L.N., Timofeev K.N., Ivanov I.I., Rubin A.B., Seibert M. Production of reactive oxygen species in decoupled,  $\text{Ca}^{2+}$ -depleted PSII and their use in assigning a function to chloride on both sides of PSII. *Photosynth. Res.*, 2013, vol. 117, pp. 385-399.
7. Ono T., Inoue Y. Abnormal redox reactions in photosynthetic  $\text{O}_2$ -evolving centers in NaCl/EDTA-washed PSII. A dark-stable EPR multiline signal and an unknown positive charge accumulator. *Biochim. Biophys. Acta*, 1990, vol. 1020, pp. 269-277.
8. Boussac A., Zimmermann J.-L., Rutherford A.W. EPR signals from modified charge accumulation states of the oxygen evolving enzyme in  $\text{Ca}^{2+}$ -deficient photosystem II. *Biochemistry*, 1989, vol. 28, pp. 8984-8989.
9. Sivaraja M., Tso J., Dismukes G.C. A calcium-specific site influence the structure and activity of the manganese cluster responsible for photosynthetic water oxidation. *Biochemistry*, 1989, vol. 28, pp. 9459-9464.
10. Hallahan B.J., Nugent J.H.A., Warden J.T., Evans M.C.W. Investigation of the origin of the "S3" EPR signal from the oxygen-evolving complex of photosystem 2: the role of tyrosine. *Z. Biochemistry*, 1992, vol. 31, pp. 4562-4573.
11. Baumgarten M., Philo J.S., Dismukes G.C. Mechanism of photoinhibition of photosynthetic water oxidation by chloride depletion and fluoride substitution: oxidation of a protein residue. *Biochemistry*, 1990, vol. 29, pp. 10814-10822.
12. MacLachlan D.J., Nugent J.H.A. Investigation of the S3 Electron Paramagnetic Resonance Signal from the Oxygen-Evolving Complex of Photosystem 2: Effect of Inhibition of Oxygen Evolution by Acetate. *Biochemistry*, 1993, vol. 32, pp. 9772-9780.
13. Szalai V.A., Kühne H., Lakshmi K.V., Brudvig G.W. Characterization of the Interaction between Manganese and Tyrosine Z in Acetate-Inhibited Photosystem II. *Biochemistry*, 1998, vol. 37, pp. 13594-13603.
14. 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.
15. Dunahay T.G., Staechelin L.A., Seibert M., Ogilvie P.D., Berg S.P. Structural biochemical and biophysical characterization of four oxygen-evolving Photosystem 2 preparations from spinach. *Biochim. Biophys. Acta*, 1984, vol. 764, pp. 179-193.
16. Polander B.C., Barry B.A. A hydrogen-bonding network plays a catalytic role in photosynthetic oxygen evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2012, vol. 109, pp. 6112-6117.
17. Polander B.C., Barry B.A. Detection of an intermediary, protonated water cluster in photosynthetic oxygen evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2013, vol. 110, pp. 10634-10639.
18. Kuntzleman T., Haddy A. Fluoride inhibition of photosystem II and the effect of removal of the PsbQ subunit. *Photosynth. Res.*, 2009, vol. 102, pp. 7-19.
19. Sandusky P.O., Yocum C.F. The chloride requirement for photosynthetic oxygen evolution: factors affecting nucleophilic displacement of chloride from the oxygen-evolving complex. *Biochim. Biophys. Acta*, 1986, vol. 849, pp. 85-93.
20. Tsuno M., Suzuki H., Kondo T., Mino H., Noguchi T. Interaction and Inhibitory Effect of Ammonium Cation in the Oxygen Evolving Center of Photosystem II. *Biochemistry*, 2011, vol. 50, pp. 2506-2514.
21. Sandusky P.O., Yocum C.F. The chloride requirement for photosynthetic oxygen evolution. Analysis of the effects of chloride and other anions on amine inhibition of the oxygen-evolving complex. *Biochim. Biophys. Acta*, 1984, vol. 766, pp. 603-611.