

**pH-ЗАВИСИМЫЕ ОБРАТИМЫЕ И НЕОБРАТИМЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ В КИСЛОРОД-ВЫДЕЛЯЮЩЕМ КОМПЛЕКСЕ ФОТОСИСТЕМЫ 2**

Ловягина Е.Р., 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.** Исследованы обратимые и необратимые эффекты воздействия pH среды на реакции выделения кислорода и восстановления экзогенного акцептора электронов 2,6-дихлорфенолиндофенола (ДХФИФ) мембранными препаратами фотосистемы 2 (ФС2) шпината. Препараты ФС2 инкубировали в буфере с исследуемым значением pH, после чего мембраны переводили в буфер с оптимальным pH 6,5 и измеряли светоиндуцированное выделение O<sub>2</sub> и восстановление ДХФИФ. Максимальная функциональная активность при комнатной температуре наблюдалась в области pH 6,5. Небольшое снижение скорости восстановления ДХФИФ (около 10%) отмечалось после инкубации препаратов при pH 4,5 и 7,5. Скорость выделения O<sub>2</sub> подавлялась более значительно при pH 4,5 (остаточная активность 40%) и менее эффективно после инкубации при pH 7,5 (остаточная активность 80%). Поскольку после инкубации образцов ФС2 в буфере с исследуемым pH активность их измерялась в буфере с оптимальным pH (6,5), наблюдаемые изменения активности отражают только необратимые изменения в мембранах под воздействием pH, тогда как при стандартном измерении O<sub>2</sub>-выделяющей активности (в буфере с исследуемым pH) наблюдаемые изменения активности вызваны сочетанием как необратимых, так и обратимых воздействий pH на мембраны. При стандартном измерении pH-зависимость демонстрирует колоколообразную форму кривой. Сравнение pH-зависимостей, полученных этими двумя способами, позволяет предположить, что ингибирование реакции выделения кислорода в области pH 4,5 обусловлено необратимыми изменениями, возможно связанными с диссоциацией периферических белков PsbQ и PsbP, тогда как в области слабощелочных pH ингибирование реакции синтеза O<sub>2</sub> связано главным образом с обратимыми pH-зависимыми изменениями, возможно, с процессом протонирования/депротонирования аминокислоты (например, гистидина).

**Ключевые слова:** фотосистема 2, кислород-выделяющий комплекс, pH, температура, кислород, транспорт электронов.

**pH-DEPENDENT REVERSIBLE AND IRREVERSIBLE CHANGES IN OXYGEN-EVOLVING COMPLEX OF PHOTOSYSTEM II**

Lovyagina E.R., Semin B.K.

Moscow State University

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

**Abstract.** pH dependence of oxygen evolution and reduction of exogenous electron acceptor 2,6-dichlorophenolindophenol (DCPIP) by spinach membrane preparations of photosystem II (PSII) was investigated. PSII membranes were incubated in the buffer with pH which is explored, then membranes were pelleted by centrifugation, suspended in buffer with pH 6.5 and light-induced O<sub>2</sub> evolution and DCPIP reduction were measured. At room temperature the maximum of functional activity was observed at pH around 6.5. Small decrease of the DCPIP reduction rate (about 10%) was observed after incubation at pH 4.5 and 7.5. The rate of O<sub>2</sub> evolution is inhibited rather significantly at pH 4.5 (residual activity is about 40%) and more weakly at pH 7.5 (residual activity is about 80%). Since after the treatment of PSII samples by buffer with pH which is explored the functional activity was measured in the buffer with optimal pH (6.5) observed changes of activity reflect only irreversible effects of pH on the membranes whereas during standard measurement of O<sub>2</sub> evolving activity (in buffer which is explored) observed changes of activity are the result not only irreversible but also reversible pH-dependent changes. Standard measurement of pH dependence of O<sub>2</sub> evolution demonstrates the bell shape form of curve. Comparison of these two pH dependences permit to suggest that inhibition of O<sub>2</sub> evolution in the region of pH 4.5 is the result of irreversible changes, possibly, connected with dissociation of extrinsic proteins PsbQ and PsbP whereas inhibition of O<sub>2</sub> evolution in the alkaline region of pH is determined mainly by reversible pH-dependent changes, possibly connected with protonation/deprotonation of amino acid (for example, histidine).

**Key words:** photosystem II, oxygen-evolving complex, pH, temperature, oxygen, electron transport.

**Введение.**

Фотосистема 2 (ФС2) является компонентом фотосинтетического аппарата высших растений, наиболее чувствительным к стрессовым воздействиям, таким, например, как высокая температура [1-4]. В настоящее время установлено, что термоинактивация функции выделения кислорода обусловлена диссоциацией внешних белков кислород-выделяющего комплекса (КВК), которая наблюдается при прогревании ФС2 при ~40°C [1]. Более того, показано, что первопричиной инактивации является именно диссоциация белка 33 кДа, но не разрушение Mn<sub>4</sub>Ca-кластера [3]. Ингибирование электронного транспорта на акцепторной стороне ФС2 от Q<sub>A</sub> к Q<sub>B</sub> наблюдается только при температурах выше 42°C [4]. Однако в исследованиях, посвященных проблеме термоинактивации ФС2, практически нет работ, в которых изучалась бы pH зависимость этого процесса, хотя pH среды может оказать значительное воздействие на чувствительность донорной стороны ФС2 к температуре за счет влияния на

протонирование/депротонирование компонентов, входящих в состав КВК. В этой связи мы планируем изучить воздействие рН среды на процесс термоинактивации ФС2. В представленной работе мы исследовали рН зависимости выделения кислорода кислород-выделяющим комплексом ФС2 и электронного транспорта по электрон-транспортной цепи ФС2 от КВК к экзогенному акцептору электронов 2,6-дихлорфенолиндофенолу (ДХФИФ) при температуре 22°C.

#### Материалы и методы.

Исследования проводили на препаратах ФС2 с активным КВК, которые выделяли из шпината согласно методике [5]. Функциональные и спектральные характеристики использованных препаратов соответствовали опубликованным ранее [5,6]. Препараты хранили при температуре -80°C в буфере А, содержащем 15 мМ NaCl, 400 мМ сахарозу и 50 мМ Mes-NaOH (рН 6,5). В этом же буфере проводили все измерения. Инкубацию препаратов ФС2 в буфере с исследуемым рН проводили следующим образом. ФС2 с концентрацией хлорофилла 50 мкг/мл помещали в прогретый до комнатной (22°C) температуры буфер, содержащий 15 мМ NaCl, 400 мМ сахарозу и 50 мМ Mes-NaOH (рН 4,5-6,5) либо 15 мМ NaCl, 400 мМ сахарозу и 50 мМ Hepes (рН 6,9-7,5). Препараты инкубировали в течение 15 минут в темноте, затем резко охлаждали во льду 3 минуты, центрифугировали при 16000xg 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 (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. 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> [7].

*Исследование эффекта рН среды на выделение кислорода ФС2.* Стандартный способ исследования эффекта рН, используемый в работах [8-10], заключается в суспендировании частиц ФС2 в буфере с заданным рН и измерении скорости фотоиндуцированного выделения кислорода в том же буфере. Такой способ отражает изменения активности, вызванные сочетанием как необратимых, но и обратимых воздействий рН на мембраны. В нашей работе мы исследовали влияние рН, используя в основном описанный выше способ, отражающий изменения активности, вызванные только необратимыми изменениями в КВК под воздействием рН.

*Исследование эффекта рН среды на скорость электронного транспорта в ФС2.* Для измерения скорости электронного транспорта чаще всего применяется акцептор электронов ДХФИФ, восстановление которого легко регистрируется спектрофотометрически, поскольку восстановленный ДХФИФ имеет большой коэффициент экстинкции (21,8 мМ<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup>). Однако использовать данный акцептор при измерениях рН эффекта стандартным способом нельзя, поскольку ДХФИФ может переходить из протонированной формы (синяя форма) в депротонированную (розовая форма) и обратно с рК реакции 5,9 [7]. Розовая и синяя формы значительно отличаются положением максимума поглощения и коэффициентом экстинкции. Поэтому регистрация эффекта рН на электронный транспорт в области рК ДХФИФ возможна только вторым способом (измерение не в среде с исследуемым рН, а в среде с оптимальным рН 6,5). В то же время измерение влияния рН на электронный транспорт через ФС2 представляет интерес, поскольку при разрушении КВК наиболее чувствительной реакцией является выделение молекулярного кислорода, тогда как реакция окисления воды все еще может иметь место (эффект разобщения [11]). В этом случае молекулы воды окисляются не до кислорода, а до перекиси водорода [12].

#### Результаты и обсуждение.

Результаты исследования рН эффекта на реакцию выделения кислорода ФС2 при температуре 22°C, полученные стандартным методом измерения (O<sub>2</sub> измеряется в буфере с исследуемым рН), представлены на рисунке 1А. Зависимость имеет колоколообразную форму с максимумом в области рН 6,0-6,5. При увеличении рН до 7,5 или уменьшении до 4,5 наблюдается значительное снижение кислород-выделяющей активности ФС2 (до 48% и 32%, соответственно). Эти результаты соответствуют данным, опубликованным другими авторами [8-10].

В то же время зависимость скорости выделения кислорода от рН, определенная другим методом (сначала инкубация препаратов в среде с заданным рН, затем перенесение их в буфер с рН 6,5 и выполнение всех измерений в этом буфере), значительно отличается (см. рис. 1Б, —○—). В области кислых значений рН скорость выделения кислорода снижается до ~40% при рН 4,5, тогда как в области слабощелочных рН наблюдается уменьшение только до 80%, т.е. кривая имеет ассиметричную форму в отличие от кривой, полученной стандартным методом измерения (см. рис. 1А). Как уже отмечалось выше, если эффект рН измеряется в буфере обработки, то он определяется обратимым и необратимым влиянием рН. Если же после обработки препарат возвращается в буфер с оптимальным рН, то мы измеряем только эффект необратимых изменений, индуцируемых рН. Согласно этим представлениям мы можем сказать, что в области слабокислотных рН происходит главным образом необратимая инактивация КВК, тогда как в области слабощелочных рН инактивация в основном обратима. Принимая во внимание полученные результаты, мы можем предположить, что в области слабокислотных рН инактивация КВК связана с диссоциацией периферических белков PsbP и PsbQ, рК которых, соответственно, равны 5,0 и 4,1 [13]. Диссоциация Mn-стабилизирующего белка PsbO происходит при сильнокислых рН за пределами наших измерений (рК равно 3,6). В свою очередь обратимое воздействие рН в области 7,5 может быть связано с протонированием/депротонированием гистидина вблизи марганцевого кластера. Один гистидин (D1-N332) является лигандом марганца Mn1 [14] и еще один гистидин (D1-N337)

образует водородную связь с марганцевым кластером. Щелочные pH также могут вызвать удаление Cl на донорной стороне ФС2 путем депротонирования Cl-связывающей группы [15] или путем замещения его OH<sup>-</sup> [16,17].

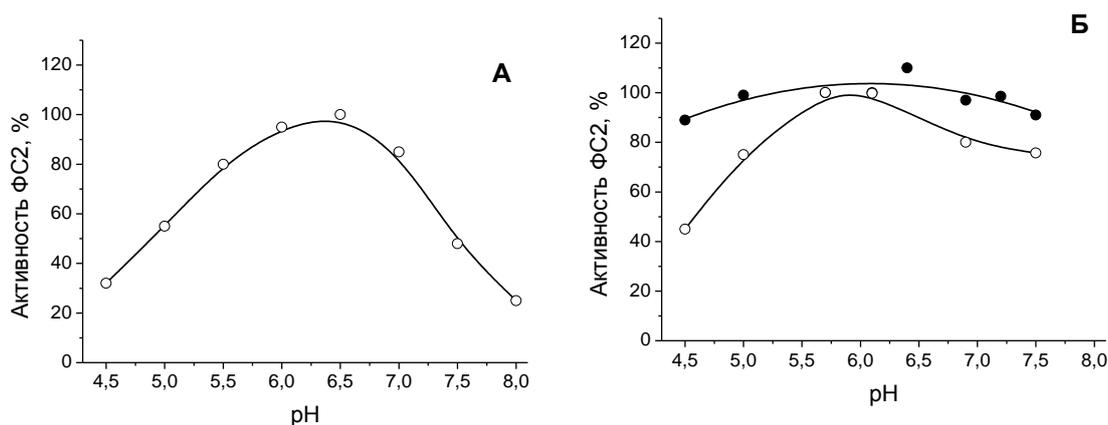


Рисунок 1 – pH-зависимости скоростей выделения кислорода (—○—) и восстановления ДХФИФ (—●—) нативными препаратами ФС2. А – частицы ФС2 инкубировали в буфере с заданным pH при температуре 22°C. Измерение скорости фотоиндуцированного выделения кислорода проводили в том же буфере. Б – образцы инкубировали в буфере с заданным pH в течение 15 мин при 22°C в темноте. Все измерения проводили в буфере с pH 6,5. 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

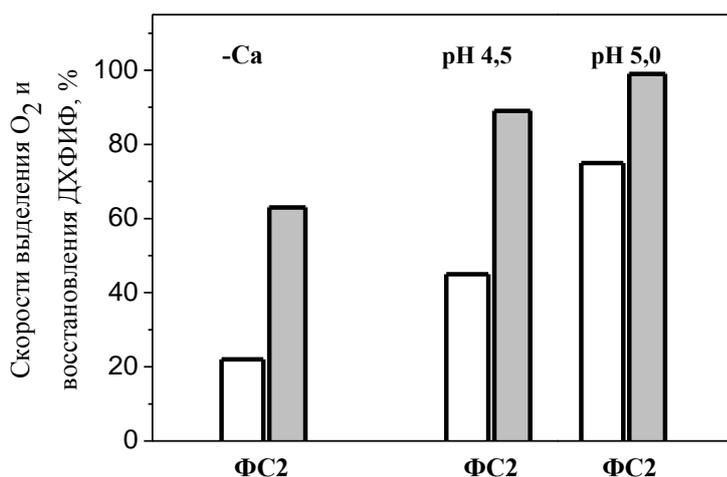


Рисунок 2 – Величины разобщающего эффекта (скорость восстановления ДХФИФ – серые столбцы; скорость выделения кислорода – белые столбцы) при удалении катионов Ca<sup>2+</sup> из КВК и обработке нативных препаратов ФС2 буфером с pH 4,5 и 5,0. Все измерения проводили в буфере с pH 6,5

В отличие от скорости выделения кислорода скорость электронного транспорта через ФС2 практически не зависит от обработки мембран буфером с pH в интервале 4,5 – 7,5 (см. рис. 1Б, —●—). Небольшое снижение скорости восстановления ДХФИФ (около 10%) отмечалось лишь после инкубации препаратов в буфере с крайними значениями pH – 4,5 и 7,5. Из приведенных данных видно, что при обработке препаратов ФС2 слабокислыми pH в интервале 4,5-5,0 наблюдается хорошо выраженный эффект разобщения функции выделения кислорода и электронного транспорта. На рис. 2 показана разница в скоростях электронного транспорта и выделения кислорода при удалении ионов Ca<sup>2+</sup> из КВК и обработке препаратов ФС2 буфером с pH 4,5 и 5,0. Из рисунка видно, что при экстракции ионов Ca<sup>2+</sup> наблюдается разобщающий эффект (разность между скоростями восстановления ДХФИФ и выделения кислорода), равный 41%. Обработка ФС2 мембран буфером с pH 4,5 вызывает схожий по величине эффект разобщения (44%). В случае обработки препаратов буфером с pH 5,0 он составляет 25%. Таким образом, мы можем заключить, что обработка ФС2 средой со слабокислыми pH разобщает электрон-транспортные процессы и синтез молекулярного кислорода в ФС2. Светоиндуцированный электронный транспорт в таких препаратах, по-видимому, осуществляется за счет неполного окисления молекул воды до промежуточного продукта – перекиси водорода, как и в случае удаления из КВК катиона Ca<sup>2+</sup> [12]. Полученные результаты позволяют предположить, что при обработке препаратов ФС2 средой с pH 4,5 происходит не только диссоциация двух периферических белков PsbP и PsbQ, но и удаление катиона Ca<sup>2+</sup> из КВК.

**Список литературы / References:**

1. Yamane Y., Kashino Y., Koike H., Satoh K. Effects of high temperatures on the photosynthetic systems in spinach: oxygen-evolving activities, fluorescence characteristics and the denaturation process. *Photosynth. Res.*, 1998, vol. 57, pp. 51-59.
2. Busheva M., Tzonova I., Stoitchkova K., Andreeva A. Heat-induced reorganization of the structure of photosystem II membranes. Role of oxygen evolving complex. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 2012, vol. 117, pp. 214-221.
3. Enami I., Kitamura M., Tomo T., Isokawa Y., Ohta H., Katoh S. Is the primary cause of thermal inactivation of oxygen evolution in spinach PS II membranes release of the extrinsic protein or of Mn? *Biochim. Biophys. Acta*, 1994, vol. 1186, pp. 52-58.
4. Pospisil P., Tuystjarvi E. Molecular mechanism of high-temperature induced inhibition of acceptor side of photosystem II. *Photosynth. Res.*, 1999, vol. 62, pp. 55-66.
5. 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.
6. 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.
7. Armstrong J.M. The molar extinction coefficient of 2,6-dichlorophenolindophenol. *Biochim. Biophys. Acta*, 1964, vol. 86, pp. 194-197.
8. 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, vol. 30, pp. 830-839.
9. 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, vol. 55, pp. 138-144.
10. Commet A., Boswell N., Yocum C.F., Popelka H. pH optimum of the Photosystem II H<sub>2</sub>O oxidation reaction: effects of PsbO, the manganese-stabilizing protein, Cl<sup>-</sup> retention, and deprotonation of a component required for O<sub>2</sub> evolution activity. *Biochemistry*, 2012, vol. 51, pp. 3808-3818.
11. 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<sup>2+</sup>-depleted PSII membranes. *Photosynth. Res.*, 2008, vol. 98, pp. 235-249.
12. 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<sup>2+</sup>-depleted PSII and their use in assigning a function to chloride on both sides of PSII. *Photosynth. Res.*, 2013, vol. 117, pp. 385-399.
13. 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, vol. 32(3), pp. 453-457.
14. 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.
15. Homann P.H. The chloride and calcium requirement of photosynthetic water oxidation: effects of pH. *Biochim. Biophys. Acta*, 1988, vol. 93, pp. 1-13.
16. Briantais J.M., Verotte C., Lavergne J., Arntzen C.J. Identification of S<sub>2</sub> as the sensitive state to alkaline photoinactivation of Photosystem II in chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta*, 1977, vol. 461, pp. 61-74.
17. Schlodder E., Meyer B. pH dependence of oxygen evolution and reduction kinetics of photooxidized chlorophyll a<sub>II</sub> (P-680) in Photosystem II particles from *Synechococcus sp.* *Biochim. Biophys. Acta*, 1987, vol. 890, pp. 23-31.

**ВЛИЯНИЕ ГИПЕРТЕРМИИ И ИММОБИЛИЗАЦИИ НА ДЕФОРМИРУЕМОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ У КРЫС**

Дигурова И.И.

Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова

ул. Островитянова, 1, г. Москва, РФ

e-mail: digurova56@mail.ru

**Аннотация.** На экспериментальной модели 30-минутной гипертермии и 12-часовой иммобилизации у крыс проанализировано изменение индекса деформируемости эритроцитов. Направления изменений этого показателя под влиянием экстремального воздействия зависят от значений, наблюдающихся до стресса.

**Ключевые слова:** экспериментальный стресс, иммобилизация, гипертермия, крысы, адаптация, деформируемость эритроцитов.