

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 577.355.2

Особенности окисления катионов Mn(II) в мембранных препаратах фотосистемы 2 без кислород-выделяющего комплекса. Эволюционный аспект**Е.Р. Ловягина*** , **Л.Н. Давлетшина** , **Б.К. Семин** *Кафедра биофизики, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12***e-mail: elena.lovayagina@gmail.com*

Одним из основных этапов в процессе трансформации энергии света в окислительных организмах является извлечение электронов из воды, которые необходимы для световой стадии фотосинтеза. Светозависимое окисление воды осуществляется кислород-выделяющим комплексом (КВК), каталитическим центром которого является кластер Mn_4CaO_5 . КВК расположен в фотосистеме 2 (ФС2) с внутренней стороны тилакоидной мембраны. Эволюционное происхождение ФС2 неясно, так же, как и происхождение марганцевого кластера в КВК. Недавно Джонсон с соавторами (2013) предположили, что в первичной ФС2 в Архейском периоде кластер Mn_4CaO_5 отсутствовал, а ФС2 окисляла не воду, а катионы Mn(II), т.е. источником электронов были катионы марганца. В представленной работе мы исследовали возможность влияния некоторых факторов окружающей среды (ионы цитрата и пероксид водорода) на скорость окисления катионов Mn(II) ФС2, не содержащей КВК. Мы установили, что цитрат ингибирует окисление катионов марганца, связывая их, но не экстрагирует катионы марганца из КВК. Пероксид водорода, наоборот, значительно увеличивает скорость окисления марганца (с 28 ± 2 до 145 ± 7 мкмоль 2,6-дихлорофенолиндофенола (мг хлорофилла) $^{-1} \cdot ч^{-1}$ в присутствии пероксида водорода). Подобные эффекты следует учитывать при исследовании процесса окисления катионов марганца фотосистемой как возможного источника электронов на ранних стадиях эволюции.

Ключевые слова: эволюция фотосистем, фотосистема 2, кислород-выделяющий комплекс, марганец, цитрат, пероксид водорода

Фотосинтетический пигмент-белковый комплекс, называемый фотосистема 2 (ФС2), реализует фундаментальную биоэнергетическую реакцию в фотосинтезирующих окислительных организмах (растения, водоросли, цианобактерии) – окисление воды, которая сопровождается синтезом молекулярного кислорода, выбрасываемого в атмосферу. Осуществляется эта реакция кислород-выделяющим комплексом (КВК), центром которого является кластер Mn_4CaO_5 . Молекулярная структура этого кластера с высоким разрешением $1,9 \text{ \AA}$ была определена с использованием рентгеноструктурного анализа [1] и подтверждена в последующей работе с применением фемтосекундной лазерной техники [2], позволяющей исследовать кристаллы ФС2 без сопутствующего их повреждения рентгеновским излучением. Кластер имеет форму неправильного куба, в котором три катиона марганца и катион Ca^{2+} соединены между собой кислородными мостиками. С кубом двумя кислородными мостиками (O4 и O5) соединен четвертый катион Mn. Поглощение квантов света

первичным донором ФС2 приводит к окислению катионов марганца, электроны которых используются в дальнейших процессах синтеза биомассы посредством фиксации CO_2 . После поглощения четырех квантов света происходит окисление двух молекул воды и восстановление марганцевого кластера до исходного состояния. Однако, несмотря на наличие информации об атомной структуре кластера Mn_4CaO_5 , принцип его работы во многом остается неясным.

Фактически первичным источником электронов, используемых ФС2, являются катионы марганца, и это послужило основанием для гипотезы эволюционного происхождения КВК, предложенной Джонсоном с соавт. [3]. Согласно этой гипотезе протофотосистема 2, имеющая первичный донор с очень большим редокс-потенциалом, до появления КВК могла использовать в качестве донора электронов не молекулы воды, а катионы Mn(II). В то же время фотосинтетические бактериальные реакционные центры (РЦ) 2-го типа, являющиеся эволюционными предшественника-

ми ФС2, могли использовать в качестве источника электронов комплексы катионов марганца с бикарбонатом, имеющие гораздо меньший редокс-потенциал, что обеспечивало возможность их окисления бактериальными РЦ, первичный донор которых имеет относительно низкий редокс-потенциал [4, 5]. Действительно, анализ геологических и геохимических данных осадочных образцов из южной Африки (палеопротерозойский период, возраст >2,4 млрд лет) показал большое содержание осадочных пород марганца, демонстрирующее интенсивное окисление катионов марганца, хотя содержание кислорода в воде и атмосфере в этот период было довольно низким. Необходимо отметить, что в случае данного варианта эволюционного развития возможность окисления катионов марганца, растворенных в воде, протофотосистемой 2 могла иметь место только при наличии в фотосистеме первичного донора с высоким редокс-потенциалом (около 1,2 В) типа P680, способным обеспечивать окисление этих катионов. Недавно был предложен механизм, предполагающий возможность участия в эволюционном развитии окислительного фотосинтеза более примитивных фотосистем 2-го типа, имеющих первичные доноры с гораздо меньшим редокс-потенциалом. Исследуя возможность участия бикарбоната в работе КВК, Климов с соавт. обнаружили, что комплекс катиона марганца с бикарбонатом, имеющий достаточно низкий редокс-потенциал 0,52–0,68 В [6], способен окисляться бактериальными РЦ 2-го типа [4, 7–9], а при определенных условиях и фотосистемой 1 [5]. Эти результаты значительно расширяют возможную роль процесса окисления катионов Mn(II) в эволюционном развитии окислительного фотосинтеза.

Недавно Чернев с соавт. [10] получили дополнительные доказательства, поддерживающие гипотезу Джонсона и соавт. [3]. Они обнаружили, что светозависимое окисление катионов Mn(II) ФС2 без КВК [ФС2(-Mn)] сопровождается образованием наночастиц окиси Mn(III, IV) типа бернессита, которые могли быть прототипом марганцевого кластера современных кислород-выделяющих организмов. Однако следует отметить, что реакция окисления катионов Mn(II) ФС2(-Mn) может быть чувствительна к факторам окружающей среды, так как в современных организмах центр окисления КВК защищен белковым слоем из периферических белков, не пропускающим молекулы и ионы. В то же время ФС2(-Mn) не содержит таких белков, и центр окисления катионов Mn(II) доступен для потенциально вредных факторов, которые могут влиять на реакцию окисления этих катионов. Например, недавно мы показали, что на процесс окисления Mn(II) существенно влияют катионы Fe(II), которые могут эффективно связываться с Mn-связывающим участком и блокировать его [11]. В настоящей ра-

боте мы исследовали влияние органических кислот (цитрат-ионы) и пероксида водорода на процесс окисления катионов Mn(II) в препаратах ФС2(-Mn).

Материалы и методы

Препараты ФС2, способные к фотоиндуцированному выделению молекулярного кислорода, получали согласно ранее опубликованной методике [12] из листьев рыночного шпината *Spinacia oleracea* L. Препараты хранили при температуре -80 °С в буфере А следующего состава: 400 мМ сахароза, 15 мМ NaCl, 50 мМ MES/NaOH, pH 6,5. Экстракцию катионов марганца из КВК препаратов ФС2 осуществляли путем обработки их 0,8 М Трис-НСl буфером (pH 8,5) при концентрации хлорофилла 0,5 мг/мл в течение 15 мин при комнатном освещении ($5 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$) и температуре 22 °С. Полученные препараты ФС2(-Mn) переводили в буфер А посредством центрифугирования $16100 \text{ г} \times 5 \text{ мин}$ и дважды отмывали от экстрагированных катионов Mn(II) и остатков Трис-буфера. Такая обработка препаратов ФС2 удаляла не только Mn-кластер, но и ионы Ca^{2+} , а также все периферические белки ФС2. Остаточное количество катионов марганца не превышало $0,2 \pm 0,1 \text{ Мн/РЦ}$, что соответствует литературным данным ($\leq 0,2 \text{ Мн/РЦ}$ [10]). Концентрацию хлорофилла определяли в 80%-ном растворе ацетона согласно ранее описанному методу [13].

Фотоиндуцированную скорость электронного транспорта в препаратах ФС2(-Mn) регистрировали фотометрически на спектрофотометре Specord UV-VIS (Carl Zeiss Jena, Германия) в кювете с четырьмя отполированными гранями (длина оптического пути 0,5 см). Источником возбуждающего света был светодиод XBDR0Y (Cree Inc., США) с максимумом излучения 450 нм и насыщающей интенсивностью света $1500 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$. Для отсекающего возбуждающего света перед фотоэлектронным умножителем спектрофотометра устанавливали оранжевый стеклянный светофильтр ОС-14. В качестве окрашенного акцептора электронов использовали 2,6-дихлорофенолиндофенол (ДХФИФ), обесцвечивающийся при восстановлении. Фотоиндуцированные изменения оптической плотности регистрировали при длине волны 600 нм – максимуме поглощения синей формы ДХФИФ. Концентрация ДХФИФ во всех измерениях составляла 40 мкМ. Скорость восстановления ДХФИФ определяли за первые 15 с освещения препаратов насыщающим светом (по тангенсу угла наклона линейного участка кинетической кривой). Для расчетов использовали коэффициент молярной экстинкции депротонированной формы ДХФИФ, равный $21,8 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ [14].

Количество катионов марганца в КВК контролировали с помощью метода колориметрического определения концентрации Mn(II) [15]

с небольшими изменениями, изложенными ранее [16]. Суспензию препаратов ФС2 в буфере А (концентрация хлорофилла 100 мкг/мл) инкубировали с 50 мМ CaCl₂ при 5 °С в темноте в течение 2 мин для удаления неспецифически связанных ионов Mn [17, 18]. Затем мембраны ФС2 осаждали и осадок ресуспендировали в 0,6 Н HCl в объемном соотношении 1:9 для экстракции функционального Mn из КВК. После 10-кратного разбавления дистиллированной водой суспензию центрифугировали (15000g × 3 мин) и супернатант фильтровали через нейлоновую мембрану с порами 0,2 мкм (Pall Life Sciences, Ann Arbor, США). К 0,9 мл фильтрата последовательно добавляли 40 мкл 2 М NaOH, 40 мкл раствора 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (100 мг в 100 мл 0,1 М HCl) и 40 мкл 5,3 М H₃PO₄. Для определения концентрации Mn(II) регистрировали поглощение при 450 нм (коэффициент экстинкции 34 мМ⁻¹ · см⁻¹) [19]. При расчете концентрации РЦ ФС2 принимали количество молекул хлорофилла на РЦ равным 250 [20].

Обработку препаратов ФС2(-Mn) средой с рН 3,0 проводили следующим образом. Размороженные препараты ФС2(-Mn) с помощью центрифугирования переводили в цитратный буфер следующего состава: 400 мМ сахароза, 15 мМ NaCl, 15 мМ лимонная кислота/цитрат Na, рН 3,0. Инкубацию проводили при концентрации хлорофилла 100 мкг/мл в течение 3 мин в темноте при комнатной температуре. Перед измерением скорости электронного транспорта препарат разбавляли в 5 раз буфером А для создания рН среды 6,4.

Результаты и обсуждение

В процессе эволюционного развития РЦ 2-го типа до появления Mn₄CaO₅ кластера и образования КВК фотосистема могла использовать в качестве источника электронов вместо воды другие доноры электронов, в том числе пероксид водорода [21]. Пероксид водорода имеет небольшой среднеточечный потенциал E_m = 0,27 В [21], допускающий возможность окисления его первичным донором бактериального РЦ второго типа. Бланкеншип и Хантер [21] предположили, что пероксид водорода мог быть донором электронов для протофотосистемы 2 и в его окислении могла принимать участие Mn-содержащая каталаза. Однако позже Дисмюкс с соавторами [4] отметили две причины малой убедительности этой гипотезы. Во-первых, нет очевидной гомологии между Mn-каталазой и Mn-связывающим доменом в КВК, а во-вторых, нет доказательств существования обильного источника пероксида водорода в Архейский период.

Тем не менее, в случае участия катионов марганца в качестве донора электронов пероксид водорода может играть существенную роль. Суть ее заключается в том, что пероксид водорода значительно увеличивает скорость окисления катионов

Mn(II) в ФС2 без марганцевого/кальциевого кластера. Механизм этого эффекта состоит в следующем: катион Mn(II) связывается с высокоаффинным Mn-связывающим участком в ФС2(-Mn), окисляется радикалом редокс-активного остатка тирозина-161 белка D1 (Y_Z'), после чего катион Mn(III) восстанавливается пероксидом водорода [22–24]. Это приводит к значительному увеличению скорости окисления катионов марганца в ФС2(-Mn). На рис. 1 показаны типичные примеры кинетики окисления Mn(II) препаратами ФС2(-Mn) в отсутствие (кривая 2) и в присутствии (кривая 3) пероксида водорода. Результаты демонстрируют, что скорость окисления Mn(II) в присутствии 3 мМ пероксида водорода увеличивается с 28±2 до 145±7 мкмоль ДХФИФ · (мг хлорофилла)⁻¹ · ч⁻¹. Полученные величины скорости окисления Mn(II) в присутствии пероксида достаточно близки к величинам, определенным нами ранее (около 180 и 120 мкмоль ДХФИФ · (мг хлорофилла)⁻¹ · ч⁻¹ [25, 26]), но существенно меньше значений, опубликованных Иноу с соавт. (370–420 мкмоль ДХФИФ · (мг хлорофилла)⁻¹ · ч⁻¹) [27, 28]. Это отличие может быть обусловлено разными методами получения препаратов ФС2, сортом и качеством шпината, составом инкубационной среды. Кроме того, причиной значительного разброса в величинах регистрируемых скоростей восстановления ДХФИФ может быть использование ненасыщающей концентрации акцептора (40 мкМ) из-за высокой оптической плотности, в то время как насыщающая его концентрация составляет 80 мкМ. Скорость светозависимого восстановления ДХФИФ в мембранных препаратах ФС2(-Mn), поддерживаемая другим электронным донором – 1,5-дифенилкарбазидом, донирующим электроны в ФС2(-Mn) через два участка – высокоаффинный и низкоаффинный [29], также достаточно сильно варьирует и может составлять, например, 90 [26] или 163 [25] мкмоль ДХФИФ · (мг хлорофилла⁻¹) · ч⁻¹, что в среднем близко к величине скорости окисления донорной пары [Mn(II) + H₂O₂] (см. выше).

На скорость окисления катионов Mn(II) могут влиять и органические соединения, способные связывать катионы металлов. К таким соединениям относятся органические кислоты [30]. В представленной работе мы исследовали влияние лимонной кислоты на процесс окисления катионов марганца в препаратах ФС2(-Mn). Выбор этой кислоты обусловлен тем, что она достаточно часто используется в исследованиях роли катиона Ca²⁺ в КВК ФС2 [31] и не влияет на процесс окисления воды в реконструированных препаратах после их обработки цитратом. На рис. 2 представлены результаты измерения концентрационной зависимости скорости окисления Mn(II) препаратом ФС2(-Mn) в буфере без цитрата натрия (кривая 1) и в присутствии 3 мМ цитрат-ионов (кривая 2).

Поскольку катионы Mn(II) окисляются таким препаратом с довольно низкой скоростью (28 ± 2 мкмоль ДХФИФ \cdot (мг хлорофилла) $^{-1} \cdot \text{ч}^{-1}$, см. рис. 1), в эксперименте регистрировали скорость их окисления в присутствии пероксида водорода, который увеличивает ее более чем в 5 раз (рис. 1, кривая 3). Полученные результаты свидетельствуют о том, что цитрат ингибирует процесс окисления Mn и происходит это за счет связывания катиона цитрат-ионом. Константа диссоциации (K1) комплекса цитрат-Mn(II) имеет небольшую величину 3,7 [30], что объясняет донирование электронов (около 40%) при концентрации Mn(II) 2 мкМ и цитрата 3 мМ, а также 100%-ное донирование при повышении концентрации Mn(II) до 100 мкМ (при концентрации цитрата 3 мМ). Низкая эффективность взаимодействия цитрат-ионов с Mn не позволяет им экстрагировать марганец из марганцевого кластера КВК, однако неспецифически связанные с мембраной катионы марганца (около 0,4 Mn на 250 молекул хлорофилла в мембранном препарате ФС2) цитрат удаляет (таблица 1). Эта величина соответствует количеству неспецифически связанных катионов Mn (0,6 Mn/400 молекул хлорофилла в тилакоидах), определенному ранее [17]. Обычно перед определением содержания Mn в ФС2 осуществляется процедура удаления неспецифически связанных катионов, и с этой целью препарат обрабатывают 50 мМ раствором Ca²⁺ [17, 18]. Полученные нами результаты показывают, что с этой же целью может быть использован и цитрат-ион.

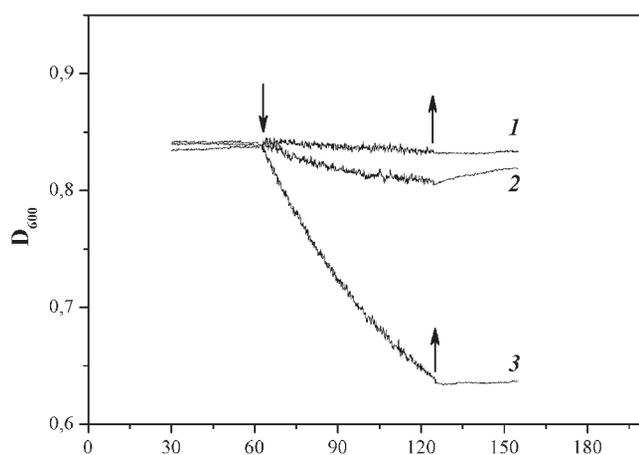


Рис. 1. Кинетические кривые фотоиндуцированного восстановления ДХФИФ (2,6-дихлорофенолиндофенола) мембранными препаратами ФС2(-Mn) при длине волны 600 нм. 1 – в отсутствие экзогенного донора электронов; 2 – в качестве донора электронов использованы катионы Mn(II) (50 мкМ); 3 – в качестве донора электронов использованы катионы Mn(II) (2 мкМ) в сочетании с пероксидом водорода (3 мМ). Концентрация хлорофилла составляла 10 мкг/мл. Стрелками обозначены моменты включения (↓) и выключения (↑) возбуждающего света. Приведены типичные кинетические кривые, полученные не менее, чем в трех повторностях.

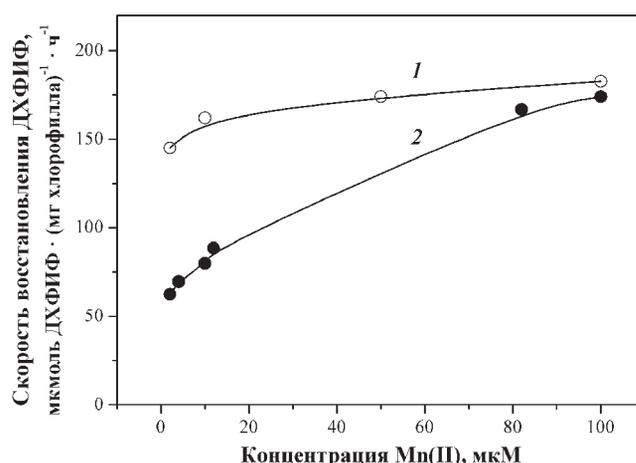


Рис. 2. Влияние цитрата натрия на скорость светоиндуцированного окисления катионов Mn(II) в мембранах ФС2(-Mn). Кривая 1 – зависимость электрон-транспортной активности препаратов ФС2(-Mn) от концентрации марганца в донорной системе [Mn(II) + H₂O₂]. Раствор MnCl₂ добавляли к суспензии ФС2(-Mn) в буфере А (рН 6,5) непосредственно перед измерением активности (концентрация хлорофилла 20 мкг/мл). Концентрация H₂O₂ во всех измерениях составляла 3 мМ. Кривая 2 – раствор MnCl₂ добавляли к суспензии препаратов ФС2(-Mn) в цитратном буфере (рН 3,0) при концентрации хлорофилла 100 мкг/мл. Инкубацию проводили в течение 3 мин в темноте при комнатной температуре, затем препарат разбавляли в 5 раз буфером А (результатирующий рН ~6,4) и определяли электрон-транспортную активность, измеряя скорость восстановления ДХФИФ (2,6-дихлорофенолиндофенола) при освещении препарата. Перед измерением активности добавляли донорную систему [2 мкМ Mn(II) + 3 мМ H₂O₂], либо только 3 мМ H₂O₂. Концентрация ДХФИФ составляла 40 мкМ, цитрата в буфере при измерении активности – 3 мМ. Данные являются средними арифметическими значений, полученных по крайней мере в трех независимых экспериментах. Стандартная ошибка каждого находится в пределах $\pm 5\%$.

Таблица

Содержание катионов марганца в ФС2 после обработки цитратом

Образец	Содержание Mn на РЦ
* ФС2 без обработки Ca ²⁺	4,4 ± 0,2
** ФС2 после обработки раствором Ca ²⁺	3,9 ± 0,2
*** ФС2 после обработки цитрат-ионами (3 мМ)	3,9 ± 0,2

Примечание: * – обработка ФС2 мембран раствором CaCl₂ для удаления неспецифически связанных с мембранами катионов Mn(II) не проводилась.

** – содержание катионов Mn в КВК ФС2 определяли согласно методике, описанной в разделе «Материалы и методы», т.е. после обработки раствором Ca²⁺ (50 мМ).

*** – препарат ФС2 перед определением содержания катионов марганца суспендировали в смешанном буфере (20% 15 мМ цитратного буфера, рН 3,0 + 80% буфера А, рН 6,5), рН которого 6,4. Препарат ФС2 (100 мкг хлорофилла/мл) инкубировали 3 мин в темноте при комнатной температуре, затем центрифугировали (16100g × 15 мин), после чего осадок мембран отмывали буфером А. Содержание катионов марганца в переосажденной ФС2 определяли с помощью колориметрического метода, описанного в разделе «Материалы и методы», но без обработки раствором CaCl₂.

Таким образом, полученные результаты показывают, что на окисление катионов марганца в препаратах ФС2 без КВК заметное влияние могут оказывать пероксид водорода и органические кислоты. Подобные эффекты следует учитывать при исследовании процесса окисления ФС2 катионов марганца как возможного источника электронов на ранних стадиях эволюции.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

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. N 7345. P. 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. N 7532. P. 99–103.
3. Johnson J.E., Webb S.M., Thomas K., Ono S., Kirschvink J.L., Fischer W.W. Manganese-oxidizing photosynthesis before the rise of cyanobacteria // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2013. Vol. 110. N 28. P. 11238–11243.
4. Dismukes G.C., Klimov V.V., Baranov S.V., Kozlov Y.N., Dasgupta J., Tyryshkin A. The origin of atmospheric oxygen on Earth: the innovation of oxygenic photosynthesis // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2001. Vol. 98. N 5. P. 2170–2175.
5. Terentyev V.V., Zharmukhamedov S.K. Evolutionary loss of the ability of the photosystem I primary electron donor for the redox interaction with Mn-bicarbonate complexes // *Biochemistry (Mosc.)*. 2020. Vol. 85. N 6. P. 697–708.
6. Kozlov Y.N., Zharmukhamedov S.K., Tikhonov K.G., Dasgupta J., Kazakova A.A., Dismukes G.C., Klimov V.V. Oxidation potentials and electron donation to photosystem II of manganese complexes containing bicarbonate and carboxylate ligands // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2004. Vol. 6. N 20. P. 4905–4911.
7. Khorobrykh A.A., Terentyev V.V., Zharmukhamedov S.K., Klimov V.V. Redox interaction of Mn–bicarbonate complexes with reaction centres of purple bacteria // *Phil. Trans. R. Soc. B: Biol. Sci.* 2008. Vol. 363. N 1494. P. 1245–1251.
8. Terentyev V.V., Shkuropatov A.Y., Shkuropatova V.A., Shuvalov V.A., Klimov V.V. Investigation of the Redox interaction between Mn-bicarbonate complexes and reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides* R-26, *Chromatium minutissimum*, and *Chloroflexus aurantiacus* // *Biochemistry (Mosc.)*. 2011. Vol. 76. N 12. P. 1360–1366.
9. Khorobrykh A., Dasgupta J., Kolling D.R., Terentyev V., Klimov V.V., Dismukes G.C. Evolutionary origins of the photosynthetic water oxidation cluster: bicarbonate permits Mn²⁺ photo-oxidation by anoxygenic bacterial reaction centers // *ChemBioChem*. 2013. Vol. 14. N 14. P. 1725–1731.
10. Chernev P., Fischer S., Hoffmann J., Oliver N., Assunção R., Yu B., Burnap R.L., Zaharieva I., Nürnberg D.J., Haumann M., Dau H. Light-driven formation of manganese oxide by today's photosystem II supports evolutionarily ancient manganese-oxidizing photosynthesis // *Nat. Commun.* 2020. Vol. 11. Art. ID 6110.
11. Semin B.K., Ghirardi M.L., Seibert M. Blocking of electron donation by Mn (II) to Y_Z[•] following incubation of Mn-depleted photosystem II membranes with Fe (II) in the light // *Biochemistry*. 2002. Vol. 41. N 18. P. 5854–5864.
12. Ghanotakis D.F., Babcock G.T. Hydroxylamine as an inhibitor between Z and P680 in photosystem II // *FEBS Lett.* 1983. Vol. 153. N 1. P. 231–234.
13. 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 Bioenerg.* 1989. Vol. 975. N 3. P. 384–394.
14. Armstrong J.M.D. The molar extinction coefficient of 2,6-dichlorophenol indophenol // *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 1964. Vol. 86. N 1. P. 194–197.
15. Semin B.K., Seibert M. A simple colorimetric determination of the manganese content in photosynthetic membranes // *Photosynth. Res.* 2009. Vol. 100. N 1. P. 45–48.
16. Semin B.K., Davletshina L.N., Ivanov I.I., Seibert M., Rubin A.B. Rapid degradation of the tetrameric Mn cluster in illuminated, PsbO-depleted photosystem II preparations // *Biochemistry (Mosc.)*. 2012. Vol. 77. N 2. P. 152–156.
17. Yocum C.F., Yerkes C.T., Blankenship R.E., Sharp R.R., Babcock G.T. Stoichiometry, inhibitor sensitivity, and organization of manganese associated with photosynthetic oxygen evolution // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1981. Vol. 78. N 12. P. 7507–7511.
18. Kuntzleman T., McCarrick R., Penner-Hahn J., Yocum C. Probing reactive sites within the photosystem II manganese cluster: evidence for separate populations of manganese that differ in redox potential // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2004. Vol. 6. N 20. P. 4897–4904.
19. Serrat F.B. 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine for the colorimetric determination of manganese in water // *Microchim. Acta*. 1998. Vol. 129. P. 77–80.
20. Xu Q., Bricker T.M. Structural organization of proteins on the oxidizing side of photosystem II. Two molecules of the 33-kDa manganese-stabilizing proteins per reaction center // *J. Biol. Chem.* 1992. Vol. 267. N 36. P. 25816–25821.
21. Blankenship R.E., Hartman H. The origin and evolution of oxygenic photosynthesis // *Trends Biochem. Sci.* 1998. Vol. 23. N 3. P. 94–97.
22. Boussac A., Picaud M., Etienne A.-L. Effect of potassium iridic chloride on the electron donation by Mn²⁺ to photosystem II particles // *Photochem. Photobiophys.* 1986. Vol. 10. P. 201–211.
23. Inoue H., Wada T. Requirement of manganese for electron donation of hydrogen peroxide in photosystem II reaction center complex // *Plant Cell Physiol.* 1987. Vol. 28. N 5. P. 767–773.
24. Hoganson C.W., Ghanotakis D.F., Babcock G.T., Yocum C.F. Mn²⁺ reduces Y_Z[•] in manganese-depleted photosystem II preparations // *Photosynth. Res.* 1989. Vol. 22. N 3. P. 285–293.

25. *Semin B.K., Davletshina L.N., Timofeev K.N., Ivanov I.I., Rubin A.B., Seibert M.* Production of reactive oxygen species in decoupled, Ca²⁺-depleted PSII and their use in assigning a function to chloride on both sides of PSII // *Photosynth. Res.* 2013. Vol. 117. N 1. P. 385–399.
26. *Lovyagina E.R., Loktyushkin A.V., Semin B.K.* Effective binding of Tb³⁺ and La³⁺ cations on the donor side of Mn-depleted photosystem II // *J. Biol. Inorg. Chem.* 2021. Vol. 26. N 1. P. 1–11.
27. *Inoué H., Akahori H., Noguchi M.* Activation of electron donation from hydrogen peroxide by manganese in non-oxygen evolving photosystem II particles // *Plant Cell Physiol.* 1987. Vol. 28. N 7. P. 1339–1343.
28. *Inoué H., Wada T.* Requirement of manganese for electron donation of hydrogen peroxide in photosystem II reaction center complex // *Plant Cell Physiol.* 1987. Vol. 28. N. 5. P. 767–773.
29. *Kurashov V.N., Lovyagina E.R., Shkolnikov D.Y., Solntsev M.K., Mamedov M.D., Semin B.K.* Investigation of the low-affinity oxidation site for exogenous electron donors in the Mn-depleted photosystem II complexes // *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* 2009. Vol. 1787. N 12. P. 1492–1498.
30. *Dawson R.M.C., Elliott D.C., Elliott W.H., Jones K.M.* Data for biochemical research. 3rd Ed. Oxford: Clarendon press, 1989. 592 pp.
31. *Ono T., Inoue Y.* Discrete extraction of the Ca atom functional for O₂ evolution in higher plant photosystem II by a simple low pH treatment // *FEBS Lett.* 1988. Vol. 227. N 2. P. 147–152.

Поступила в редакцию 15.02.2022

После доработки 13.04.2022

Принята в печать 12.05.2022

RESEARCH ARTICLE

Peculiarities of Mn(II) cation oxidation in the photosystem II without oxygen-evolving complex. Evolutionary aspect

E.R. Lovyagina* , L.N. Davletshina , B.K. Semin 

*Department of Biophysics, School of Biology,
Lomonosov Moscow State University, 1–12 Leninskie gory, Moscow, 119234, Russia*

**email: elena.lovyagina@gmail.com*

One of the main reactions in the process of the light energy transformation in oxygenic organisms is the extraction of electrons from water, which are necessary for the light stage of photosynthesis. The light-dependent oxidation of water is carried out by an oxygen-evolving complex (OEC), the catalytic center of which is the cluster Mn₄CaO₅. OEC is located in photosystem II (PSII) on the lumen side of thylakoid membrane. The evolutionary origin of the PSII is unclear, as is the origin of the manganese cluster in the OEC. Recently, Johnson et al. (2013) suggested that in the primary PSII in the Archean period, the cluster Mn₄CaO₅ was absent, and PSII oxidized not water, but Mn(II) cations, i.e., manganese cations were the source of electrons. In the presented work, we investigated the possibility of the influence of some environmental factors (citrate and hydrogen peroxide) on the oxidation rate of Mn(II) cations by a PSII that does not contain OEC. We found that citrate inhibit the oxidation of Mn(II) cations binding them but doesn't extract Mn cations from OEC. Hydrogen peroxide, on the contrary, significantly increases the oxidation rate of manganese (from 28±2 to 145±7 μmol 2,6-dichlorophenolindophenol mg Chl⁻¹ h⁻¹ in the presence of H₂O₂). Such effects should be taken into account when investigating the oxidation of manganese cations by the photosystem as a possible source of electrons in the early stages of evolution.

Keywords: *evolution of photosystems, photosystem II, oxygen-evolving complex, manganese, citrate, hydrogen peroxide*

Funding: The research was carried out as part of the Scientific Project of the State Order of the Government of Russian Federation to Lomonosov Moscow State University No. 121032500058-7

Сведения об авторах

Ловягина Елена Рудольфовна – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-33-15; e-mail: elena.lovyagina@gmail.com; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-3586-0575>

Давлетшина Лира Назиповна – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-33-15; e-mail: davlet@biophys.msu.ru; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-2702-0891>

Семин Борис Константинович – докт. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-33-15; e-mail: semin@biophys.msu.ru; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-0058-2798>