ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 577.355.2

Темновое химическое блокирование высокоаффинного Mn-связывающего участка фотосистемы 2 катионами Fe(II)

Е.Р. Ловягина*, А.В. Локтюшкин, Н.С. Васильев, 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.lovyagina@gmail.com*

Связывание катиона Fe(II) с высокоаффинным Mn-связывающим участком (ВАУ) фотосистемы 2 без кислород-выделяющего комплекса (ФС2(-Mn)) состоит из нескольких этапов – высоко-специфическая ассоциация катиона Fe(II) с ВАУ, окисление связанного катиона радикалом тирозина $Y_Z^{\bullet}$, генерируемым в результате поглощения кванта света первичным донором P680 и разделения зарядов в реакционном центре, прочное связывание катиона Fe(III) с ВАУ, что приводит к блокированию (фотохимическому) ВАУ. В настоящей работе мы показали, что блокирование ВАУ катионом Fe может быть достигнуто не только фотохимическим способом, но и химическим: слабо связанный с ВАУ катион Fe(II) может быть окислен H_2O_2, что приводит к образованию Fe(III) и блокированию им ВАУ в результате прочного связывания. Однако эффективность химического блокирования существенно меньше фотохимического. Этот факт свидетельствует о том, что фотохимическое блокирование является не одноквантовым, а, по крайней мере, двухквантовым процессом. Полученные данные свидетельствуют в пользу двухквантового механизма физиологически очень важного процесса – фотоактивации (реконструкция марганцевого кластера в частицах ФС2(-Mn) в процессе их инкубации при освещении с катионами Mn(II)).

Ключевые слова: *фотосистема 2, фотоактивация, кислород-выделяющий комплекс, марганец-связывающий участок, железо, пероксид водорода*

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-80-1-2

Введение

Процесс взаимодействия катионов Mn(II) с фотосистемой 2 (ФС2) без кислород-выделяющего комплекса (КВК) представляет значительный интерес и интенсивно изучается. Причиной этого является высокая интенсивность фотоингибирования ФС2, в результате которого с большой скоростью разрушается полипептид D1 – основной Mn-связывающий компонент КВК (время полураспада 2,4 ч в листьях ячменя [1]). Поэтому в оксигенных организмах постоянно идет процесс реконструкции марганцевого кластера. Механизм этого процесса интенсивно исследуется *in vitro* [2]. Установлено, что на первоначальном этапе катионы Mn(II) специфически, но слабо связываются с высокоаффинным Mn-связывающим участком (ВАУ) ФС2 без марганца (ФС2(-Mn)), после чего окисляются радикалом тирозина $Y_Z^{\bullet}$, генерируемым в результате поглощения кванта света первичным донором P680 и разделения зарядов в реакционном центре. В результате этого процесса происходит связывание окисленного катиона Mn с ВАУ. Далее поглощение второго кванта света через определенный темновой интервал сопровождается связыванием второго катиона и образованием димера. Следует отметить, что ВАУ может связывать также катионы Fe(II) с эффективностью, сопоставимой с эффективностью связывания катионов Mn(II) [3–4], причем с такой же последовательностью этапов [5]. Необходимым условием связывания катионов Fe(II) с ВАУ (так же, как и катионов Mn(II)) является наличие света. Свет обеспечивает разделение зарядов в реакционном центре ФС2(-Mn) и генерацию окислителя – тирозина $Y_Z^{\bullet}$, окисляющего ассоциированный с ВАУ катион Fe(II). Образующийся катион Fe(III) прочно связывается с ВАУ и препятствует связыванию с этим участком экзогенных катионов Mn(II) (блокирование ВАУ). В темноте блокирование ВАУ катионами Fe(II) не происходит.

© Ловягина Е.Р., Локтюшкин А.В., Васильев Н.С., Семин Б.К., 2025

Аналогичное развитие событий имеет место и при другом способе связывания катионов Fe с Mn-связывающими участками, при котором Fe(II)-катион замещает один или два катиона Mn в КВК [6–7]. Замещение возможно в препаратах ФС2 без Ca(II) в КВК. Следует отметить, что в процессе экстракции Ca(II) удаляются и два периферических белка PsbQ и PsbP. Потеря этих белков открывает доступ катионов Fe(II) к катионам Mn, в результате чего происходит взаимодействие катионов металлов между собой: окисленный катион Mn является очень сильным окислителем и окисляет катион Fe(II) (редокс-потенциал около 0 мВ в нейтральной среде [8]). Восстановленный катион Mn(II) покидает участок связывания, а его место занимает катион Fe(III). Процесс замещения происходит в темноте. Таким образом, эти два примера показывают, что для связывания катионов Fe с Mn-связывающим участком необходимы не только катионы Fe(II), но и агент, способный их окислять.

Учитывая эти факты, мы исследовали возможность связывания катионов Fe(II) с ВАУ ФС2(-Mn) в присутствии сильного окислителя – H_2O_2, эффективно реагирующего с катионами Fe(II), окисляя их (реакция Фентона).

Материалы и методы

Препараты ФС2 ВВУ-типа были выделены из свежих листьев рыночного шпината *Spinacia oleracea* L. согласно опубликованной ранее методике [9]. Полученные препараты хранили при –80°C в буфере А, содержащем 15 мМ NaCl, 400 мМ сахарозу, 50 мМ 2-(*N*-морфолино)этансульфоновую кислоту (Mes), pH 6,5. Удаление белков КВК и катионов марганцевого кластера проводили путем обработки препаратов ФС2 при концентрации хлорофилла (Хл) 0,5 мг · мл$^{-1}$ 0,8 М буфером Tris–HCl (pH 8,5) в течение 15 мин при комнатном освещении (4–5 мкЭ · м$^{-2}$ · с$^{-1}$) и комнатной температуре (22°C). Затем препараты центрифугировали в течение 3 мин при 16100 g, дважды переосаждали в буфере А и хранили при –80°C при концентрации 1 мг Хл · мл$^{-1}$. Помимо катионов Mn, полученные таким образом препараты (ФС2(-Mn)) не содержали катиона Ca(II), а также внешних белков PsbQ, PsbP и PsbO, которые в нативной ФС2 препятствуют доступу экзогенных восстановителей к донорной стороне. Суммарную концентрацию хлорофилла определяли в 80%-ном растворе ацетона согласно описанному ранее методу [10]. Перед измерениями препараты размораживали в темноте в холодильнике в течение часа.

Скорость фотовосстановления экзогенного акцептора электронов 2,6-дихлорофенолиндофенола (ДХФИФ) как критерий активности электронного транспорта в препаратах ФС2 измеряли на спектрофотометре Specord UV-VIS (Carl Zeiss Jena, Германия) в кюветах с длиной оптического пути 1 см. В качестве источника возбуждающего света, обеспечивающего насыщающую интентивность 1800 мкЭ · м$^{-2}$ · с$^{-1}$, использовали светодиоды XBDROY (Cree Inc., США) с максимумом излучения 450 нм. Для отсечения возбуждающего света перед фотоэлектронным умножителем спектрофотометра устанавливали оранжевый светофильтр ОС-14. Фотоиндуцированные изменения оптической плотности ДХФИФ регистрировали при длине волны 600 нм. Для расчета скорости восстановления ДХФИФ использовали коэффициент экстинкции для его депротонированной формы $\varepsilon = 21{,}8$ мМ$^{-1}$ · см$^{-1}$ [11]. Концентрация ФС2 во всех измерениях составляла 10 мкг Хл · мл$^{-1}$.

Химическое блокирование высокоаффинного Mn-связывающего участка катионами Fe проводили следующим образом. Препараты ФС2(-Mn) (50 мкг Хл · мл$^{-1}$) инкубировали с 10 мкМ $FeSO_4$ в темноте при 4°C в течение 0,5 мин. Затем добавляли 3 мМ H_2O_2, инкубировали при тех же условиях еще 1 мин, центрифугировали при 16100g 4 мин и ресуспендировали в буфере А (10 мкг Хл · мл$^{-1}$ в случае однократной обработки и 50 мкг Хл · мл$^{-1}$ – в случае повторной). Повторную обработку препаратов проводили через 1 мин идентичным первой способом.

Представленные на рисунках и в таблице данные являются средними арифметическими значений, полученных в независимых экспериментах при не менее 3 измерениях в каждом опыте.

Результаты и обсуждение

Мембранные препараты ФС2 без Mn имеют один участок, связывающий катионы Mn(II) с высокой эффективностью (константа диссоциации 1 мкМ) [12]. Ранее мы обнаружили, что катионы Fe(II) также связываются с ВАУ с эффективностью, сопоставимой с таковой для катионов Mn(II) (50%-е связывание имеет место в области ≈ 1 мкМ) [3]. Для необратимого прочного связывания необходим свет (достаточно слабого комнатного освещения), т.е. необходимо окисление ассоциированных с ВАУ катионов Fe(II) тирозином $Y_Z^{\bullet}$. Связанный катион Fe(III) блокирует ВАУ, препятствуя взаимодействию катионов Mn(II) с этим участком [4]. На рис. 1А показана концентрационная зависимость блокирования ВАУ катионами Fe(II) при фотохимическом окислении катионов Fe(II) (комнатное освещение 3 мин). Эффективность блокирования резко увеличивается с увеличением концентрации катионов Fe(II) примерно до ≈ 2,5 мкМ, после чего достигает плато на уровне 10% электрон-транспортной активности, оцененной по скорости восстановления акцептора электронов ДХФИФ (рис. 1А). На врезке рис. 1А представлены кинетические кривые восстановления экзогенного акцептора электронов ДХФИФ контрольным препаратом ФС2(-Mn) (1) и препаратами ФС2(-Mn) после обработки катионами Fe(II)

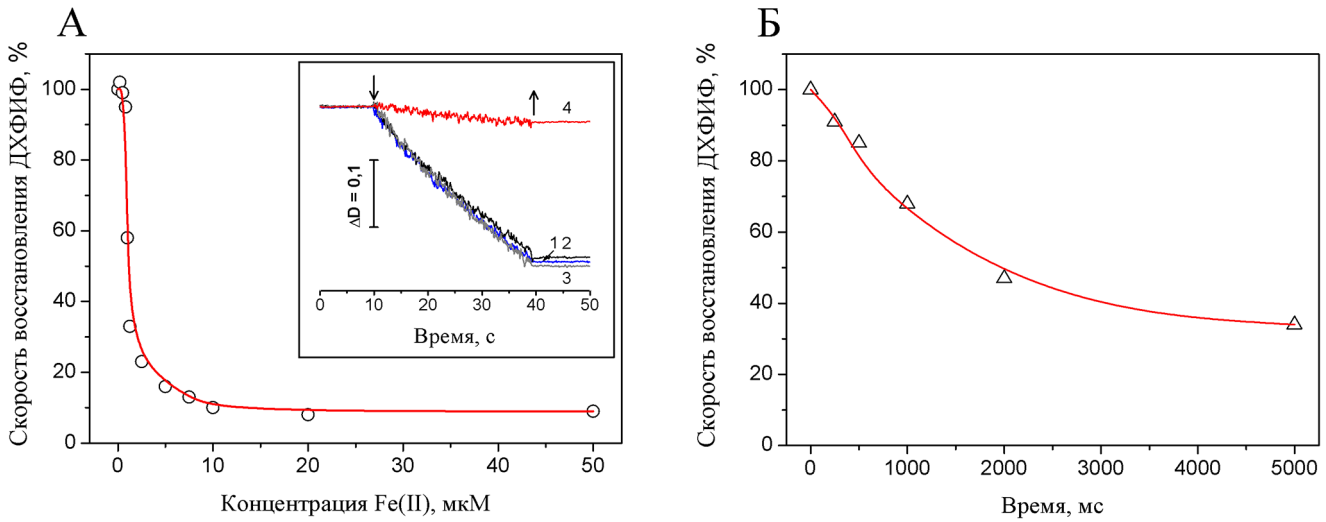

Рис. 1. Фотохимическое блокирование высокоаффинного Mn-связывающего участка катионами Fe(II) в препаратах ФС2(-Mn). **А.** Концентрационная зависимость блокирования высокоаффинного Mn-связывающего участка катионами Fe(II) в препаратах ФС2(-Mn) (фотоиндуцированное восстановление ДХФИФ в присутствии экзогенного донора электронов [Mn(II) + H_2O_2]) после 3-минутной инкубации при комнатном освещении и последующего центрифугирования. *Врезка*: Кинетические кривые восстановления ДХФИФ препаратами ФС2(-Mn): синяя кривая (1) – мембраны ФС2(-Mn) после 3-минутной инкубации в темноте и центрифугирования; черная кривая (2) – ФС2(-Mn) после 3-минутной инкубации с 10 мкМ Fe(II) в темноте и центрифугирования; серая кривая (3) – ФС2(-Mn) после 3-минутной инкубации с 3 мМ H_2O_2 в темноте и центрифугирования; красная кривая (4) – ФС2(-Mn) после 3-минутной инкубации с 10 мкМ Fe(II) на комнатном свету и центрифугирования. Концентрация ДХФИФ 40 мкМ, донорной системы – [2 мкМ Mn(II) + 3 мМ H_2O_2]. Концентрация хлорофилла 10 мкг · $мл^{-1}$. Приведены типичные кинетические кривые, полученные не менее, чем в трех повторностях. **Б.** Зависимость связывания Fe(II) (10 мкМ) с высокоаффинным участком ФС2(-Mn) от длительности вспышки насыщающего света. За 100% взята активность ФС2(-Mn) с донорной системой [Mn+H_2O_2] без предварительного освещения 140 мкмоль ДХФИФ · (мг хлорофилла)$^{-1}$ · $ч^{-1}$.

в темноте (2) и на свету (4) (с последующим центрифугированием) при их освещении в присутствии донорной системы [Mn(II) + H_2O_2]. Рис. 1Б демонстрирует зависимость связывания 10 мкМ Fe(II) с высокоаффинным участком КВК от длительности вспышки насыщающего света. Очевидно, что условия световой инкубации препаратов ФС2(-Mn) с катионами Fe(II) сильно влияют на процесс блокирования ВАУ. Так, в режиме комнатного освещения при 3-минутной инкубации с 10 мкМ Fe(II) достигалось практически полное (~90%) блокирование ВАУ (рис. 1А), в то время как насыщающая вспышка длительностью 5 с при той же концентрации Fe(II) приводила лишь к ~70% его блокирования (рис. 1Б).

В последующих экспериментах мы изучили влияние H_2O_2 на возможность связывания катионов Fe(II) с ВАУ в темноте (рис. 2). С этой целью в препарат ФС2(-Mn) добавляли катионы Fe(II) в интервале концентраций 0–40 мкМ и инкубировали в темноте 0,5 мин. Оказалось, что темновая инкубация с Fe(II) не сопровождается блокированием ВАУ (см. рис. 1, кинетическая кривая 2 на врезке). Далее мы добавляли в образец H_2O_2 (3 мМ), после инкубации в течение 1 мин в темноте осаждали мембраны ФС2(-Mn) центрифугированием и суспендировали их в буфере А. Измерение электрон-транспортной активности (восстановление ДХФИФ) полученных препаратов при освещении в присутствии донорной пары Mn(II) + H_2O_2

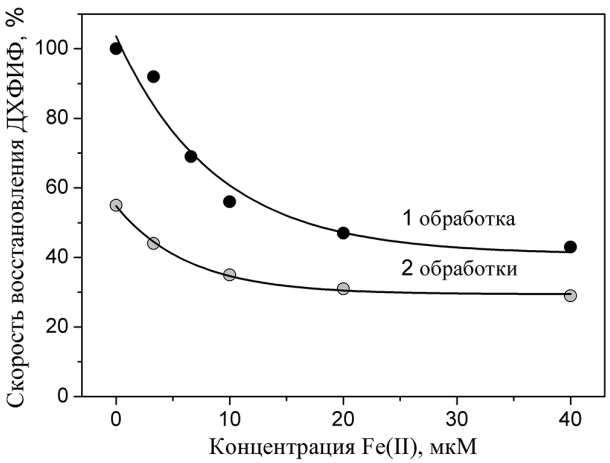

Рис. 2. Концентрационная зависимость блокирования высокоаффинного Mn-связывающего участка катионами Fe(II) в препаратах ФС2(-Mn) после их однократной и двукратной темновой обработки катионами Fe(II) с последующим добавлением H_2O_2. При однократной обработке препарат ФС2(-Mn) (50 мкг Хл · $мл^{-1}$) инкубировали в темноте с различной концентрацией катионов Fe(II) в течение 0,5 мин, после чего добавляли H_2O_2 (3 мМ) и через 1 мин инкубации в темноте центрифугировали. Осажденные мембраны суспендировали в буфере А (10 мкг Хл · $мл^{-1}$ в случае однократной обработки и 50 мкг Хл · $мл^{-1}$ в случае повторной). Скорость восстановления ДХФИФ (40 мкМ) измеряли в присутствии электрон-донорной системы [2 мкМ Mn(II) + 3 мМ H_2O_2] в условиях насыщающего света (●). Повторную обработку препаратов проводили через 1 мин идентичным первой способом (◍). Данные являются средними арифметическими значений, полученных по крайней мере в 3 независимых экспериментах. Стандартная ошибка каждого находится в пределах ± 5%.

показало, что ВАУ после описанной обработки блокируется. Темновое блокирование четко выражено – остаточная активность около 50% при концентрации катионов Fe(II) 20 мкМ (рис. 2), но его интенсивность меньше, чем при фотохимическом блокировании – остаточная активность около 10% при концентрации катионов Fe(II) 8 мкМ (рис. 1). Полученный результат не может быть связан с темновой инкубацией с катионами Fe(II) (рис. 1, кинетическая кривая 2 на врезке). Блокирование не может быть связано и с влиянием H_2O_2 на ФС2(-Mn), о чем свидетельствуют данные, представленные на рис. 1 (кинетическая кривая 3 на врезке, эффект H_2O_2). Поскольку блокирование ВАУ осуществляется при связывании с ним окисленного катиона Fe(III) [3–4] мы предполагаем, что причиной ингибирования ВАУ в нашем темновом эксперименте является окисление катионов Fe(II) H_2O_2 (реакция Фентона) и последующего прочного связывания Fe(III) с ВАУ.

Кинетические исследования фотохимического блокирования показали, что этот эффект определяется связыванием не одного катиона Fe, а, по крайней мере, двух [4]. Учитывая тот факт, что препараты ФС2(-Mn) имеют только один участок высокого сродства для связывания катиона Mn (и, соответственно, катиона Fe) [12], мы можем предположить следующий механизм фотохимического и химического блокирования, представленный, соответственно, на рис. 3А и 3Б. При фотохимическом блокировании первый катион Fe(II) связывается с низкой аффинностью с ВАУ, затем, после поглощения фотосистемой первого кванта света, окисляется радикалом тирозина $Y_Z^{\bullet}$, образующимся в результате разделения зарядов, а окисленный катион Fe(III) уже прочно связывается с ВАУ. В результате этого формируется новый участок связывания катиона Fe (как и в случае процесса фотоактивации – связывания катионов Mn при формировании кластера [2]). Связанный с ВАУ катион Fe(III) перемещается на новый участок, а к ВАУ подходит очередной катион Fe(II), взаимодействует с ним и окисляется тирозином после поглощения фотосистемой второго кванта света. В случае химического блокирования, механизм которого представлен на рис. 3Б, в темноте катион Fe(II) слабо связывается с ВАУ, а добавление к такому препарату H_2O_2 приводит к быстрому окислению его до трехвалентного состояния (реакция Фентона) и, соответственно, к прочному связыванию катиона Fe(III) с ВАУ.

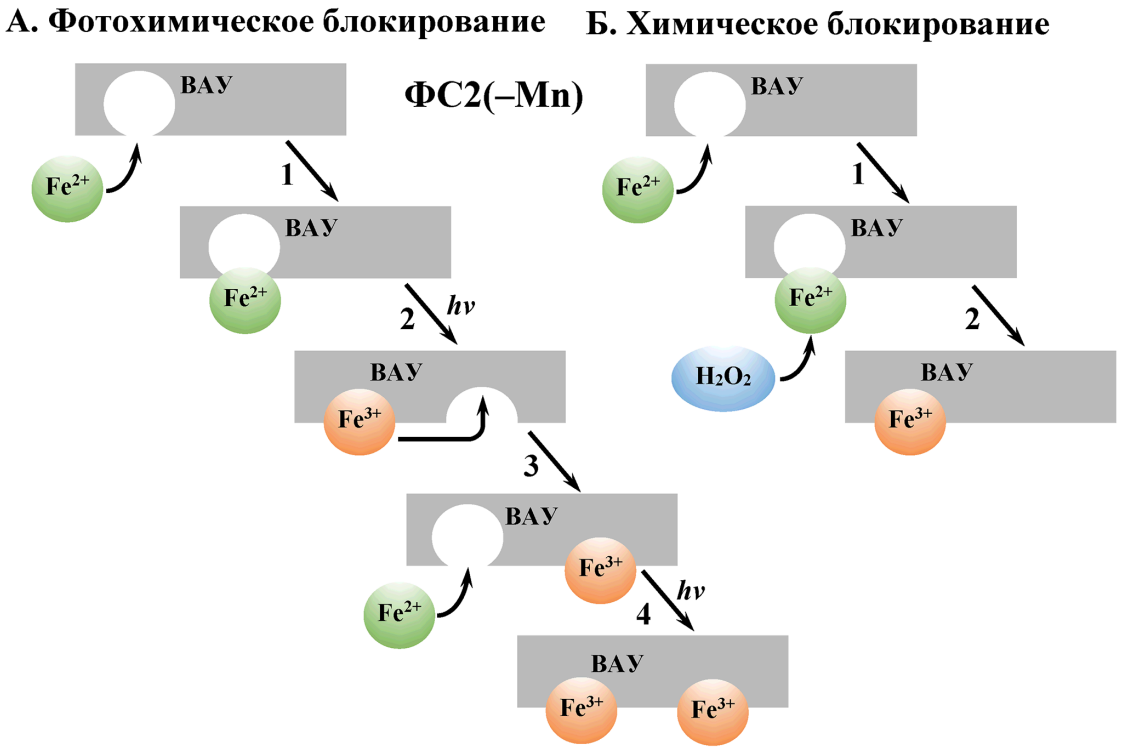

Рис. 3. Схема процессов фотохимического и химического блокирования высокоаффинного Mn-связывающего участка. **А.** Фотохимическое блокирование высокоаффинного Mn-связывающего участка катионами Fe. 1 – слабое связывание катиона Fe(II) с ВАУ; 2 – окисление Fe(II) тирозином $Y_Z^{\bullet}$ при поглощении ФС2 первого кванта света и появление нового участка связывания катиона Fe (возможно, участка связывания Mn3), инициированное прочным связыванием катиона Fe(III) с ВАУ; 3 – перемещение катиона Fe(III) с ВАУ на новый участок; 4 – окисление второго катиона Fe(II) при его взаимодействии с освободившимся ВАУ тирозином $Y_Z^{\bullet}$ при поглощении ФС2 второго кванта света. **Б.** Химическое блокирование высокоаффинного Mn-связывающего участка катионами Fe. 1 – слабое связывание катиона Fe(II) с ВАУ в темноте; 2 – окисление связанного с ВАУ катиона Fe(II) H_2O_2 и высокоаффинное связывание катиона Fe(III) с ВАУ, блокирующее электронный транспорт через этот участок.

Таблица

Химическое блокирование высокоаффинного Mn-связывающего участка препаратов ФС2(-Mn) катионами Fe(II) в присутствии катионов Mn(II) или Ca(II)

Первичная обработка препаратов ФС2(-Mn)	Повторная обработка препаратов ФС2(-Mn)	Активность препаратов (скорость восстановления ДХФИФ)
+10 мкМ Fe(II) → +3 мМ H_2O_2	–	54,5%
+10 мкМ Fe(II) + 20 мкМ Mn(II)* → +3 мМ H_2O_2	–	70%
+10 мкМ Fe(II) + 10 мМ Ca(II)* → +3 мМ H_2O_2	–	82,5%
+10 мкМ Fe(II) → +3 мМ H_2O_2	+10 мкМ Fe(II) → +3 мМ H_2O_2	36%
+10 мкМ Fe(II) → +3 мМ H_2O_2	+10 мкМ Fe(II) + 20 мкМ Mn(II)* → +3 мМ H_2O_2	45,2%
+10 мкМ Fe(II) → +3 мМ H_2O_2	+10 мкМ Fe(II) + 10 мМ Ca(II)* → +3 мМ H_2O_2	48,9%

Примечание: * – катионы Fe(II), Mn(II) или Ca(II) к препаратам ФС2(-Mn) добавляли одновременно и инкубировали смесь в течение 0,5 мин перед добавлением H_2O_2. 100% соответствует скорости восстановления ДХФИФ препаратами ФС2(-Mn) 140 мкмоль ДХФИФ · (мг хлорофилла)$^{-1}$ · ч$^{-1}$. Перед измерением активности добавляли донорную систему [2 мкМ Mn(II) + 3 мМ H_2O_2]. Концентрации ДХФИФ и хлорофилла составляли 40 мкМ и 10 мкг · мл$^{-1}$ соответственно.

Подобный механизм может объяснить более низкую эффективность химического блокирования в случае окисления катиона Fe(II) H_2O_2. В случае фотохимического блокирования ингибирование ВАУ определяется окислением и связыванием двух катионов Fe [4], тогда как при химическом блокировании в темноте добавление H_2O_2 приводит к одномоментному окислению всех катионов Fe(II) – как ассоциированных с ВАУ, так и находящихся в суспензии – благодаря значительному превышению концентрации H_2O_2 (3 мМ) над концентрацией катионов Fe(II) (10–20 мкМ). Следовательно, при химическом блокировании может образоваться только один катион Fe(III), непосредственно связанный с ВАУ. С целью проверки этой гипотезы мы исследовали эффективность блокирования ВАУ после вторичной обработки препарата катионами Fe(II).

В проведенном эксперименте препарат ФС2(-Mn) проинкубировали в темноте с Fe(II) и затем с H_2O_2. Далее мембраны были отмыты от реактивов, и обработка была повторена. Результаты эксперимента показаны на рис. 2. Полученные данные свидетельствуют, что повторная обработка приводит к увеличению эффективности блокирования ВАУ, но степень блокирования так и не достигает величины, наблюдаемой при фотоокислении катионов Fe(II). Это может быть связано с неполной идентичностью этапов связывания катионов Fe(II) с ВАУ в случае фотохимического и химического блокирования, например, с большим различием во временном интервале между связыванием 1-го и 2-го катионов Fe.

Таким образом, прочное темновое связывание катиона Fe с ВАУ обеспечивается быстрым окислением Fe(II) сильным окислителем H_2O_2. В следующем эксперименте мы проверили возможность инициирования связывания катиона Fe(II) другим окислителем – ДХФИФ (E_m лежит в диапазоне 130–217 мВ [13–14]). В этом случае блокирование тоже имеет место, но оно происходит менее эффективно, чем с H_2O_2. Остаточная активность после однократной 5-минутной инкубации составляла примерно 75%, а после повторной – примерно 50% (данные не приведены). Этот результат может быть обусловлен следующим. Взаимодействие катиона Fe(II) с H_2O_2 сопровождается не только окислением катиона, но и генерацией гидроксильного радикала. Можно предположить, что блокирование может определяться не прочным связыванием катиона Fe(III) с ВАУ, а ингибированием ВАУ гидроксильным радикалом. Однако такой механизм маловероятен. Во-первых, концентрация Fe(II) очень мала: 50%-ное блокирование при окислении катионов Fe(II) H_2O_2 наблюдается при их концентрации всего 5 мкМ (рис. 2). Во-вторых, ДХФИФ также инициирует блокирование, хотя в этом случае реакция окисления катионов Fe(II) протекает без образования этой активной формы кислорода.

В таблице приведены данные исследования влияния катионов нативного КВК на блокирование ВАУ катионами Fe(II), инициированное H_2O_2. Интересно отметить, что катионы Mn(II) в концентрации, вдвое превышающей концентрацию Fe(II) (20 мкМ и 10 мкМ соответственно), слабо ингибируют связывание катионов Fe с ВАУ, эффективность блокирования после однократной обработки снижается примерно на 15% (таблица). Это может быть связано с различным влиянием H_2O_2 на катионы Mn и Fe. H_2O_2 эффективно окисляет катионы Fe(II), тогда как по отношению к катионам Mn он является эффективным восстановителем [15–16]. Таким образом H_2O_2 препятствует

образованию катионов Mn(III) и тем самым подавляет конкуренцию катионов Mn с катионами Fe.

В отличие от катионов Mn(II) катионы Ca(II) более эффективно предотвращают блокирование ВАУ катионами Fe (остаточная активность после однократной обработки 83% при концентрации Ca(II) 10 мМ), хотя практически не связываются с ВАУ [17]. Но здесь следует отметить, что согласно данным рентгеноструктурного анализа [18] КВК имеет аминокислотный остаток аспарагиновой кислоты D1-D170, связывающий между собой (мостик) катион Ca(II) и катион Mn4, оккупирующий ВАУ. Поэтому довольно сильное влияние Ca(II) на связывание катиона Fe(II) с ВАУ может осуществляться через кальциевый участок.

Различия во влиянии катионов Mn(II) и Ca(II) на связывание катионов Fe с ВАУ при повторной обработке препаратов ФС2(-Mn) практически исчезают. Эффективность блокирования после двукратной обработки катионами Fe(II) снижается примерно на 9% и 13% в случае добавления Mn(II) и Ca(II) соответственно (таблица). Возможно, перемещение связанного с ВАУ первого катиона Fe(III) на новый участок связывания приводит к конформационным изменениям и, как следствие, к нарушению взаимодействия между Ca-связывающим участком и ВАУ.

Исследование выполнено в рамках государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Исследования выполнены без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Järvi S., Suorsa M., Aro E.M. Photosystem II repair in plant chloroplasts — regulation, assisting proteins and shared components with photosystem II biogenesis. *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics.* 2015;1847(9):900–909.

2. Oliver N., Avramov A.P., Nürnberg D.J., Dau H., Burnap R.L. From manganese oxidation to water oxidation: assembly and evolution of the water-splitting complex in photosystem II. *Photosynth. Res.* 2022;152(2):107–133.

3. Semin B.K., Ivanov I.I., Rubin A.B., Parak F. High-specific binding of Fe(II) at the Mn-binding site in Mn-depleted PSII membranes from spinach. *FEBS Lett.* 1995;375(3):223–226.

4. Semin B.K., Ghirardi M.L., Seibert M. Blocking of electron donation by Mn(II) to $Y_Z^{\bullet}$ following incubation of Mn-depleted photosystem II membranes with Fe(II) in the light. *Biochemistry*. 2002;41(18):5854–5864.

5. Semin B., Loktyushkin, A., Lovyagina E. Current analysis of cations substitution in the oxygen-evolving complex of photosystem II. *Biophys. Rev*. 2024;16(2):237–247.

6. Semin B.K., Seibert M. Substituting Fe for two of the four Mn ions in photosystem II — effects on water-oxidation. *J. Bioenerg. Biomembr.* 2016;48(3):227–240.

7. Semin B.K., Davletshina L.N., Seibert M., Rubin A.B. Creation of a 3Mn/1Fe cluster in the oxygen-evolving complex of photosystem II and investigation of its functional activity. *J. Photochem. Photobiol. B* 2018;178:192–200.

8. Widdel F., Schnell S., Heising S., Ehrenreich A., Assmus B., Schink B. Ferrous iron oxidation by anoxygenic phototrophic bacteria. *Nature.* 1993; 362(6423):834–836.

9. Ghanotakis D.F., Babcock G.T. Hydroxylamine as an inhibitor between Z and P680 in photosystem II. *FEBS Lett.* 1983;153(1):231–234.

10. 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;975(3):384–394.

11. Armstrong J.M.D. The molar extinction coefficient of 2,6-dichlorophenol indophenol. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 1964;86(1):194–197.

12. Ono T.A., Mino H. Unique binding site for Mn^{2+} ion responsible for reducing an oxidized Y_Z tyrosine in manganese-depleted photosystem II membranes. *Biochemistry* 1999;38(27):8778–8785.

13. Petrova A., Mamedov M., Ivanov B., Semenov A., Kozuleva M. Effect of artificial redox mediators on the photoinduced oxygen reduction by photosystem I complexes. *Photosynth. Res.* 2018;137(3):421–429.

14. Jahn B., Jonasson N.S., Hu H., Singer H., Pol A., Good N.M., Op den Camp H.J.M., Martinez-Gomez N.C., Daumann L.J. Understanding the chemistry of the artificial electron acceptors PES, PMS, DCPIP and Wurster's Blue in methanol dehydrogenase assays. *J. Biol. Inorg. Chem.* 2020;25(2):199–212.

15. 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;28(7):1339–1343.

16. Inoué H., Wada T. Requirement of manganese for electron donation of hydrogen peroxide in photosystem II reaction center complex. *Plant Cell Physiol.* 1987;28(5):767–773.

17. Semin B.K., Davletshina L.N., Goryachev S.N., Seibert M. Ca^{2+} effects on Fe(II) interactions with Mn-binding sites in Mn-depleted oxygen-evolving complexes of photosystem II and on Fe replacement of Mn in Mn-containing, Ca-depleted complexes. *Photosynth. Res.* 2021;147(2):229–237.

18. 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;473(7345):55–60.

Поступила в редакцию 22.10.2024
После доработки 17.04.2025
Принята в печать 14.05.2025

RESEARCH ARTICLE

Dark chemical blocking of the high-affinity Mn-binding site of photosystem II by Fe(II) cations

E.R. Lovyagina*, A.V. Loktyushkin, N.S. Vasiliev, 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*

Binding of Fe(II) iron cation to high-affinity Mn-binding site (HAS) of photosystem II without oxygen-evolving complex (PSII(-Mn)) consists of several steps – a highly specific association of the Fe(II) cation with the HAS, oxidation of the bound cation with the tyrosine radical $Y_Z^{\bullet}$, generated as a result of light absorption by the primary donor P680 and charge separation in the reaction center, strong binding of the Fe(III) cation with HAS, which leads to HAS blocking (photochemical) with an iron cation. In the present work, we have shown that blocking HAS with an iron cation can be achieved not only by a photochemical process, but also by a chemical one: the Fe(II) cation weakly bound to HAS can be oxidized by hydrogen peroxide, which leads to the formation of Fe(III) and blocking of HAS by oxidized Fe cation as a result of strong binding. However, the effectiveness of chemical blocking is less than photochemical. This fact indicates that photochemical blocking is not a single quantum, but at least a two-quantum process. The data obtained indicate the two-quantum mechanism of a physiologically very important reaction - photoactivation (reconstruction of the manganese cluster in PSII(-Mn) particles during their incubation with Mn(II) cations).

Keywords: *photosystem II, photoactivation, oxygen-evolving complex, manganese-binding site, iron, hydrogen peroxide*

Funding: The study was conducted under the state assignment of Lomonosov Moscow State University.

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: https://orcid.org/0000-0002-3586-0575

Локтюшкин Алексей Владимирович – канд. биол. наук, доц. кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-33-15; e-mail: allokt@gmail.com; ORCID: https://orcid.org/0000-0002-9082-1966

Васильев Никита Сергеевич – инженер кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-33-15; e-mail: nik_vasil@mail.ru; ORCID: https://orcid.org/0000-0001-6877-2283

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: https://orcid.org/0000-0002-0058-2798