

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 577.355.2

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ КАТИОНОВ ТЕРБИЯ С ДОНОРНОЙ СТОРОНОЙ ФОТОСИСТЕМЫ 2 ВЫСШИХ РАСТЕНИЙ

А.В. Локтюшкин*, Е.Р. Ловягина, 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: allokt@gmail.com

Фотосистема 2 (ФС2) высших растений осуществляет фотоиндуцированное окисление воды и выделение в атмосферу молекулярного кислорода в качестве побочного продукта этой реакции. Кислород-выделяющий комплекс (КВК) расположен на донорной стороне ФС2 и содержит Mn_4CaO_5 -кластер, катализирующий окисление воды. Кофактором этой реакции является катион Ca^{2+} . По некоторым физико-химическим свойствам (ионный радиус, координационное число) к ионам Ca^{2+} близки ионы лантаноидов, и в кальций-связывающих белках возможно замещение Ca^{2+} на эти катионы. Отдельные представители данной группы катионов могут связываться и с Ca-связывающим участком ФС2. Нами было исследовано взаимодействие с донорной стороной ФС2 одного из наименее изученных лантаноидов – тербия. Результаты проведенных экспериментов показали, что инкубация нативных препаратов ФС2 с катионами Tb^{3+} приводит к необратимому ингибированию функции выделения кислорода (на $\approx 75\%$ при 2 мМ Tb^{3+}). При этом электронный транспорт к переносчикам на акцепторной стороне ФС2 в значительной степени сохраняется. Добавление в среду инкубации 30 мМ Ca^{2+} уменьшает ингибирующий эффект тербия примерно вдвое. Полученные результаты хорошо соотносятся с данными измерений кинетики индукции флуоресценции в препаратах ФС2 в присутствии экзогенного Ca^{2+} и Tb^{3+} , а также позволяют предположить, что катионы тербия вытесняют Ca^{2+} из КВК. В результате замещения катиона кальция катионом тербия в каталитическом центре окисление воды происходит не до молекулярного кислорода, а до пероксида водорода, как это было показано нами ранее для ФС2 без Ca^{2+} в КВК.

Ключевые слова: фотосистема 2, кислород-выделяющий комплекс, кинетика индукции флуоресценции, кальций, лантаноиды, тербий

Фотосистема 2 (ФС2) – пигмент-белковый комплекс, связывающий ряд переносчиков электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) фотосинтеза цианобактерий, водорослей и высших растений. Белок D1 ядра ФС2 несет марганцевый кластер, обеспечивающий окисление воды и выделение молекулярного кислорода. Фотосинтетическое выделение O_2 является практически единственным источником этого газа в атмосфере Земли.

Структурные исследования показали, что активный центр кислород-выделяющего комплекса (КВК) содержит четыре иона Mn и один ион Ca^{2+} , соединенные пятью кислородными мостиками (Mn_4CaO_5 -кластер). Кластер связывает четыре молекулы воды и координируется одной имидазольной и шестью карбоксильными группами аминокислотных остатков белков D1 и CP43 ФС2 [1]. Ион Ca^{2+} является необходимым кофактором

реакции окисления воды [2], однако необходимо отметить, что пространственная структура марганцевого кластера при удалении катиона кальция изменяется незначительно. Предполагаемая роль Ca^{2+} в КВК состоит либо в «подстройке» окислительно-восстановительного потенциала марганцевого кластера [3], либо в связывании одной или двух молекул субстратной (окисляемой в ходе каталитического цикла) воды [4]. Тем не менее, конкретный механизм участия ионов Ca^{2+} в функционировании КВК до сих пор не установлен [3].

С кальций-связывающим участком КВК могут взаимодействовать и другие ионы металлов. При этом лишь инкубация препаратов ФС2 без Ca^{2+} с ионами Sr^{2+} приводит к частичному восстановлению функции выделения O_2 [5]. По некоторым физико-химическим свойствам (ионный радиус, координационное число) к ионам Ca^{2+}

также близки ионы лантаноидов Ln^{3+} , что делает их удобным инструментом исследования кальций-связывающих белков. Эффекты замещения Ca^{2+} на лантаноиды Ln^{3+} могут быть различными: от сохранения до полной утраты активности в зависимости от того, структурную или каталитическую роль в кальций-связывающем белке выполняет катион кальция [5]. Таким образом, наблюдаемый эффект непосредственно связан с конкретным механизмом участия кальция в функционировании исследуемого белка. Действие ионов лантаноидов Ln^{3+} на фотосинтетический аппарат интересно и с другой точки зрения. В связи с широким использованием их в промышленности в настоящее время становится актуальной проблема загрязнения окружающей среды этими элементами [6]. Очевидно, что в этих условиях лантаноиды могут выступать в роли токсикантов, снижающих выход фотосинтеза – основного биохимического процесса, обеспечивающего продуктивность растений.

Влияние некоторых лантаноидов на функциональную активность ФС2 изучалось в ряде работ [7–9]. Несмотря на то, что все лантаноиды проявляют весьма сходные химические свойства, были выявлены значительные различия в действии конкретных ионов на функционирование ФС2, связанные, вероятно, с их ионным радиусом [7]. В настоящей работе нами установлено, что ионы одного из малоизученных лантаноидов, тербия, снижают скорость выделения кислорода ФС2, при этом добавление экзогенного Ca^{2+} оказывает выраженное действие на КВК, защищающее от ингибирующего действия Tb^{3+} .

Материалы и методы

Препараты ФС2. Мембранные препараты ФС2 с функциональным КВК были приготовлены из рыночного шпината *Spinacia oleracea* L. согласно ранее опубликованной методике [10]. Все процедуры проводили при 4°C. Листья освобождали от жилок и гомогенизировали в буфере, содержащем 50 мМ трицин (*N*-(2-гидрокси-1,1-бис(гидроксиэтил)этил)глицин), 400 мМ сахарозу, 10 мМ NaCl, 5 мМ MgCl_2 , рН 7,8. Гомогенат фильтровали через четыре слоя капрона и освобождали от крупных фрагментов центрифугированием при 300g в течение 1 мин. Тилакоидные мембраны осаждали при 5000g в течение 5 мин и суспендировали в буфере А следующего состава: 400 мМ сахарозы, 15 мМ NaCl, 50 мМ MES (2-(*N*-морфолино)этансульфоновая кислота), рН 6,5. Полученный препарат тилакоидных мембран обрабатывали в течение 30 мин детергентом Тритон Х-100 при соотношении детергент:хлорофилл = 20:1. После солюбилизации препарат центрифугировали 30 мин при 40000g.

Осадок частиц ФС2 ресуспендировали в буфере А и хранили при температуре -80°C . Для экстракции ионов Mn и периферических белков частицы ФС2 инкубировали в течение 15 мин в 0,8 М Трис-буфере (трис(гидроксиэтил)аминометан) с рН 8,5 при комнатной температуре и освещении (концентрация хлорофилла 0,5 мг/мл). Суммарную концентрацию хлорофиллов *a* и *b* определяли в 80%-ном растворе ацетона согласно описанной ранее методике [11]. Все измерения проводили в буфере А при концентрации хлорофилла 10 мкг/мл. Раствор $\text{Tb}_2(\text{SO}_4)_3$ (5 мМ) также готовили на буфере А. Перед измерениями препараты ФС2 инкубировали с Tb^{3+} при комнатной температуре в течение 5 мин в темноте.

Активность препаратов ФС2. Кинетику фотоиндуцированного выделения кислорода препаратами ФС2 регистрировали амперометрически с помощью закрытого электрода Кларка и полярографа LP-7e (Laboratorni Pstroje, Чехословакия) в термостатируемой ячейке при 25°C в присутствии искусственного акцептора электронов 2,6-дихлоро-*n*-бензохинона (200 мкМ). Скорость выделения O_2 рассчитывали по линейному участку кинетической кривой за первые 10 с после включения света. Для калибровки величины диффузионного тока использовали значение концентрации кислорода в воде в равновесии с воздухом, равное 253 мкМ. Источниками возбуждающего света служили светодиоды XBDR0Y (Cree Inc., США) с максимумом 450 нм, обеспечивающие насыщающую интенсивность света ($1500 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$).

Кинетика индукции флуоресценции (КИФ). Кинетику индукции флуоресценции регистрировали с помощью прибора Plant Efficiency Analyzer (Hansatech Instruments Ltd., Великобритания) при постоянном освещении $1200 \text{ мкЭ} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$. Источником возбуждающего света служил светодиод с максимумом излучения 650 нм (спектральный диапазон 580–710 нм). Временное разрешение составляло 10 мкс в течение первых 2 мс регистрации интенсивности флуоресценции, 1 мс – в диапазоне 0,002–1 с и 100 мс – в диапазоне 1–2 с. При построении КИФ использовали логарифмическую шкалу по оси времени. Кривые нормировали на величину сигнала через 50 мкс после включения света.

Результаты и обсуждение

На рис. 1 (кривая 1) приведена зависимость активности ФС2, определенной по скорости выделения кислорода, от концентрации ионов тербия. Поскольку в экспериментах был использован сульфат тербия, предварительно мы убедились, что сульфат-ионы (в этом эксперименте использовали соль Na_2SO_4) не оказывают влияния на O_2 -активность ФС2. В исследованном нами диа-

пазоне концентраций Tb^{3+} (50 мкМ–2 мМ) и при длительности инкубации с катионом металла 5 мин наблюдается выраженное снижение скорости выделения кислорода мембранными препаратами ФС2. При максимальной использованной концентрации 2 мМ активность снижается до 26% от контрольного уровня. Аналогичный эффект был обнаружен при обработке ФС2 другим лантаноидом – лантаном [9]. При этом следует отметить, что 2 мМ La^{3+} практически полностью (на 94%) ингибировал выделение кислорода ФС2, в то время как в присутствии 2 мМ Tb^{3+} мы наблюдали снижение активности лишь на 74%. Однако при исследовании влияния лантаноида самария в концентрации 0,5 мМ на мембранные препараты ФС2 наблюдалось существенно меньшее ($\approx 20\%$) ингибирование кислород-выделяющей активности [7]. Аналогичные концентрации лантана [9] и тербия (рис. 1) снижали скорость выделения кислорода приблизительно на 40% и 50%, соответственно. Таким образом, несмотря на сходство лантаноидов по физико-химическим свойствам, их ингибирующее действие на ФС2 различно.

Обратимость ингибирующего действия ионов

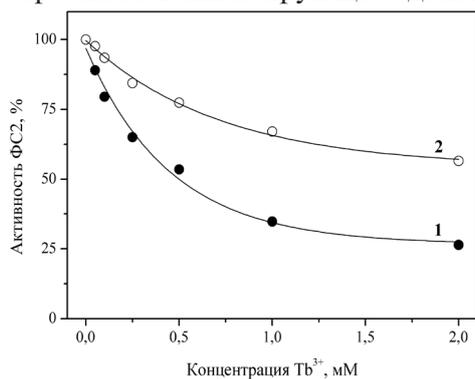


Рис. 1. Зависимость скорости выделения кислорода частицами ФС2 от концентрации Tb^{3+} в отсутствие (1) и в присутствии (2) 30 мМ $CaCl_2$. Активность 100% соответствует скорости выделения кислорода $390\text{--}430$ мкмоль $O_2 \cdot \text{мг Хл}^{-1} \cdot \text{ч}^{-1}$ в отсутствие $CaCl_2$ и $430\text{--}470$ мкмоль $O_2 \cdot \text{мг Хл}^{-1} \cdot \text{ч}^{-1}$ – в присутствии $CaCl_2$.

тербия мы проверили в следующих экспериментах. Обработанные 2 мМ Tb^{3+} частицы ФС2 (0,05 мг хлорофилла/мл) осаждали центрифугированием при 16100g в течение 10 мин и ресуспендировали в буфере А, не содержащем Tb^{3+} . После трехкратной отмывки буфером А активность препаратов не восстанавливалась и составляла 27% от контроля (активность ФС2, не обработанной тербием). Таким образом, ингибирование выделения кислорода частицами ФС2 в присутствии Tb^{3+} является необратимым.

Одним из механизмов ингибирования активности ФС2 ионами Tb^{3+} может быть нефункциональное замещение ионом тербия катиона Ca^{2+} в КВК. Чтобы проверить это предположение, мы исследовали влияние экзогенного кальция на ин-

гибирующий эффект тербия. На рис. 1 (кривая 2) приведена зависимость скорости выделения кислорода ФС2 в присутствии 30 мМ $CaCl_2$ от концентрации Tb^{3+} . Хорошо видно, что при наличии в среде ионов кальция ингибирующий эффект тербия выражен значительно слабее. Так, в присутствии 30 мМ Ca^{2+} и 2 мМ Tb^{3+} активность препаратов ФС2 снижается лишь на 43% (в то время как без Ca^{2+} – на 74%). Полученные результаты позволяют предположить, что защитное действие Ca^{2+} от ингибирования ионами Tb^{3+} может быть обусловлено конкуренцией между этими ионами за участок (или участки) связывания в КВК ФС2.

Для более детального понимания механизма ингибирования электронного транспорта в ФС2 тербием мы использовали метод регистрации КИФ. Анализ формы КИФ позволяет получить информацию о кинетике переноса электрона на конкретных участках ЭТЦ ФС2 [12]. Очевидным преимуществом данного метода является отсутствие необходимости использовать для измерения скорости электронного транспорта экзогенные акцепторы. Типичная КИФ нативных препаратов ФС2, построенная в общепринятых полулогарифмических координатах, приведена на рис. 2 (кривая 1). На КИФ препаратов ФС2 обычно выделяют два участка – О-Ж и Ж-Р, тогда как в КИФ листьев, водорослей и цианобактерий обычно присутствует плато I, расположенное между пиками Ж и Р [12]. Первый участок О-Ж отражает процесс восстановления первичного хинонного акцептора ФС2 Q_A . Рост интенсивности флуоресценции на втором участке Ж-Р связан с полным восстановлением как первичного, так и вторич-

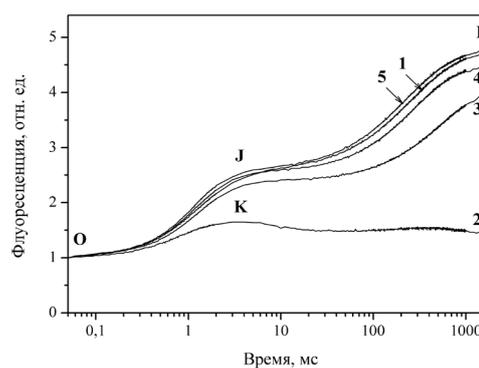


Рис. 2. Кривые индукции флуоресценции различных препаратов ФС2: 1 – контроль (нативная ФС2); 2 – ФС2 после экстракции Mn из КВК; 3 – ФС2 в присутствии 2 мМ Tb^{3+} ; 4 – ФС2 в присутствии 30 мМ $CaCl_2$ и 2 мМ Tb^{3+} ; 5 – ФС2 в присутствии 30 мМ $CaCl_2$.

ного хинонного акцептора Q_B . Экстракция Mn из КВК ФС2 путем обработки раствором Триса в щелочной среде приводит к существенному изменению формы КИФ (кривая 2 на рис. 2). После начального незначительного возрастания интенсивности флуоресценции в результате переноса

одного электрона с донорной на акцепторную часть ФС2 наблюдается её падение, в результате чего на КИФ появляется пик К. В данном случае начальное нарастание флуоресцентного сигнала связано с восстановлением первичного акцептора Q_A , а последующее падение обусловлено окислением Q_A^- пластохиноном Q_B и остатком тирозина Y_Z^+ белка D1 (в реакции рекомбинации $Y_Z^+ Q_A^-$) в условиях отсутствия притока электронов с донорной стороны ФС2 [14, 15]. Таким образом, подобная форма КИФ указывает на отсутствие донирования электронов в ЭТЦ ФС2 со стороны КВК.

Форма КИФ частиц ФС2 в присутствии 2 мМ Tb^{3+} (кривая 3 на рис. 2) сходна с формой КИФ нативной ФС2 и существенно отличается от формы кривой препаратов ФС2 после экстракции из КВК ионов Mn. Как видно из рисунка, ионы тербия практически не оказывают влияния на участок О-Ж, участок Ж-Р также сохраняется, хотя характеризуется более медленным (примерно в 2 раза по сравнению с контролем) нарастанием интенсивности флуоресценции. Для количественной оценки выявленного эффекта КИФ аппроксимировали функцией $F(t) = F_0 + A_1(1 - \exp(-t/\tau_1)) + A_2(1 - \exp(-t/\tau_2))$, где F_0 – интенсивность флуоресценции при 50 мкс, а τ_1 и τ_2 – характерные времена фаз О-Ж и Ж-Р на индукционных кривых [12]. Время τ_1 для кривых нативных частиц ФС2 и частиц, обработанных тербием, различалось незначительно (1,5 мс и 1,3 мс, соответственно), в то время как время τ_2 в присутствии 2 мМ Tb^{3+} увеличивалось примерно в 2 раза по сравнению с контролем (272 мс и 558 мс, соответственно). Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что электронный транспорт на акцепторной стороне ФС2 в присутствии тербия хотя и замедляется, но в значительной степени сохранен. Причиной замедления электронного транспорта от первичного на вторичный хинон при обработке ФС2 тербием может быть экстракция внешних белков КВК, что показано для обработки ФС2 другим лантаноидом – лантаном [9]. При удалении периферических белков с донорной стороны ФС2 сильно повышается окислительно-восстановительный потенциал Q_A , что приводит к замедлению переноса электрона на акцепторной стороне ФС2 [16]. Вывод о сохранении электронного транспорта на акцепторной стороне ФС2 согласуется с полученными нами ранее результатами о слабом ингибировании тербием активности ФС2, оцениваемой по скорости восстановления искусственного акцептора электронов 2,6-дихлорофенолиндофенола [17]. В то же время, как было отмечено выше, ионы Tb^{3+} в значительной степени ингибируют выделение кислорода ФС2. Отсюда можно заключить, что в присутствии ионов тербия наблюдается «разобщение» электронного транспорта и выделения кис-

лорода частицами ФС2. Ранее подобный феномен значительного снижения скорости фотоиндуцированного выделения кислорода на фоне сохранения способности поставлять электроны в ЭТЦ был выявлен в препаратах ФС2, из которых были экстрагированы ионы Ca^{2+} путем обработки 2 М NaCl без использования хелаторов, а также в присутствии фторид-анионов, ацетата и аммония [18, 19]. Следует отметить, что максимальный уровень флуоресценции (Р) на КИФ в наших экспериментах достигался через 1 с после начала освещения, что соответствует литературным данным [20]. Этот уровень в препаратах ФС2 сохранялся как минимум в течение 10 с. Таким образом, это позволяет достаточно адекватно сопоставлять результаты измерения выхода флуоресценции и выделения O_2 .

На рис. 2 также приведены КИФ частиц ФС2 в присутствии 30 мМ Ca^{2+} и 2 мМ Tb^{3+} (кривая 4). В этом случае КИФ приближается по форме к КИФ нативной ФС2. Характерные времена фаз О-Ж и Ж-Р (τ_1 и τ_2) составляют в этом случае 1,4 мс и 291 мс. Этот результат показывает, что защитное действие кальция от влияния тербия проявляется здесь так же, как и в случае кислород-выделяющей активности ФС2. Следует отметить, что сами ионы Ca^{2+} в использованной нами концентрации 30 мМ не оказывают выраженного влияния на КИФ ФС2 ($\tau_1 = 1,3$ мс, $\tau_2 = 249$ мс).

При объяснении выявленного нами эффекта «разобщения» в присутствии Tb^{3+} встает вопрос об идентификации донора, поддерживающего электронный транспорт в ФС2 при ингибировании функции выделения кислорода. Природа окисляемого субстрата, восстанавливающего переносчики электронов на акцепторной стороне «разобщенных» препаратов ФС2, полученных экстракцией кальция из КВК, была подробно исследована в работе [21]. Эксперименты показали, что субстратом окисления, как и в случае нативной ФС2, является вода. Однако в «разобщенных» препаратах ФС2 происходит не полное окисление воды до молекулярного кислорода, а образование промежуточного продукта окисления – пероксида водорода. Если после обработки ФС2 ионами тербия происходит вытеснение Ca^{2+} из КВК, то результатом такого процесса будет появление «разобщенных» частиц ФС2. В соответствии с особенностями функционирования КВК в таких частицах, мы можем предположить, что субстратом окисления при обработке ФС2 ионами Tb^{3+} также является вода, которая окисляется не до O_2 , а до пероксида водорода [18, 21].

Исследования выполнены без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

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. *Yocum C.F.* Calcium activation of photosynthetic water oxidation // *Biochim. Biophys. Acta*. 1991. Vol. 1059. N 1. P. 1–15.
3. *Shamsipur M., Pashabadi A.* Latest advances in PSII features and mechanism of water oxidation // *Coordin. Chem. Rev.* 2018. Vol. 374. P. 153–172.
4. *McEvoy J.P., Brudvig G.W.* Water-splitting chemistry of photosystem II // *Chem. Rev.* 2006. Vol. 106. N 11. P. 4455–4483.
5. *Yocum C.F.* The calcium and chloride requirements of the O₂ evolving complex // *Coordin. Chem. Rev.* 2008. Vol. 252. N 3–4. P. 296–305.
6. *Wang L., Zhou Q., Huang X.* Photosynthetic responses to heavy metal terbium stress in horseradish leaves // *Chemosphere*. 2009. Vol. 77. N 7. P. 1019–1025.
7. *Ono T.* Effects of lanthanide substitution at Ca²⁺-site on the properties of the oxygen evolving center of photosystem II // *J. Inorg. Biochem.* 2000. Vol. 82. N 1–4. P. 85–91.
8. *Popovic R., Carpentier R., Morin L.* Determination of fluorescence inductions in a PSII submembrane fraction affected by additives // *J. Plant Physiol.* 1988. Vol. 132. N 6. P. 754–757.
9. *Ghanotakis D.F., Babcock G.T., Yocum C.F.* Structure of the oxygen-evolving complex of Photosystem II: calcium and lanthanum compete for sites on the oxidizing side of Photosystem II which control the binding of water-soluble polypeptides and regulate the activity of the manganese complex // *Biochim. Biophys. Acta*. 1985. Vol. 809. N 2. P. 173–180.
10. *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. N 1. P. 127–130.
11. *Porra R.J., Thompson W.A., Kriedemann P.E.* Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls *a* and *b* extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy // *Biochim. Biophys. Acta*. 1989. Vol. 975. N 3. P. 384–394.
12. *Pospíšil P., Dau H.* Chlorophyll fluorescence transients of photosystem II membrane particles as a tool for studying photosynthetic oxygen evolution // *Photosynth. Res.* 2000. Vol. 65. N 1. P. 41–52.
13. *Strasser R.J., Govindjee.* On the O-J-I-P fluorescence transients in leaves and D1 mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* // *Research in photosynthesis*. Vol. 2 / Ed. M. Murata. Dordrecht: Kluwer Academic Publ., 1992. P. 29–32.
14. *Strasser B.J.* Donor side capacity of photosystem II probed by chlorophyll *a* fluorescence transients // *Photosynth. Res.* 1997. Vol. 52. N 2. P. 147–155.
15. *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. Vol. 48. N 3. P. 227–240.
16. *Johnson G.N., Rutherford A.W., Krieger A.* A change in the midpoint potential of the quinone Q_A in photosystem II associated with photoactivation of oxygen evolution // *Biochim. Biophys. Acta*. 1995. Vol. 1229. N 2. P. 202–207.
17. *Локтюшкин А.В., Ловягина Е.Р., Семин Б.К.* Ингибирование электрон-транспортной цепи фотосистемы 2 катионами тербия // *Акт. вопр. биол. физ. хим.* 2018. Т. 3. № 2. С. 250–255.
18. *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 Ca²⁺-depleted PSII membranes // *Photosynth. Res.* 2008. Vol. 98. N 1–3. P. 235–249.
19. *Lovyagina E.R., Semin B.K.* Mechanism of inhibition and decoupling of oxygen evolution from electron transfer in photosystem II by fluoride, ammonia and acetate // *J. Photochem. Photobiol. B*. 2016. Vol. 158. P. 145–153.
20. *Pospíšil P., Dau H.* Valinomycin sensitivity proves that light-induced thylakoid voltages result in millisecond phase of chlorophyll fluorescence transients // *Biochim. Biophys. Acta*. 2002. Vol. 1554. N 1–2. P. 94–100.
21. *Semin 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 1–3. P. 385–399.

Поступила в редакцию 25.02.2019 г.
После доработки 19.04.2019 г.
Принята в печать 23.04.2019 г.

RESEARCH ARTICLE

INTERACTION OF TERBIUM CATIONS WITH THE OXIDIZING SIDE OF PHOTOSYSTEM II HIGHER PLANTS

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

Department of Biophysics, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow 119234, Russia

**e-mail:allokt@gmail.com*

Photosystem 2 (PSII) of the higher plants carries out the photoinduced oxidation of water and releases the molecular oxygen into atmosphere as a by-product of this reaction. The oxygen evolving complex (OEC) is located on the donor side of PSII and contains the Mn_4CaO_5 cluster catalyzing water oxidation. A cofactor of this reaction is Ca^{2+} cation. According to some physical and chemical properties (ionic radius, a coordination number) lanthanides ions are similar to Ca^{2+} ion parameters, and in the calcium binding proteins substitution of Ca^{2+} with these cations is possible. Some representatives of this cations group can bind to Ca-binding site in the OEC of PSII. In presented paper we investigated the interaction with the PSII donor side one of the least studied lanthanides – terbium. Results of our experiments showed that the incubation of native PSII preparations with Tb^{3+} cations lead to irreversible inhibition of oxygen evolving function ($\approx 75\%$ inhibition at 2 mM of Tb^{3+}). At the same time electron transport on the acceptor side of PSII substantially remains. Addition to incubation buffer 30 mM Ca^{2+} reduces the inhibition effect of terbium approximately twice. Obtained results well correspond to the data of measurements of fluorescence induction kinetic in PSII membranes in the presence of exogenous Ca^{2+} and Tb^{3+} and allow to assume that terbium cations displace Ca^{2+} from OEC. Calcium release induced by Tb^{3+} results to incomplete water oxidation producing H_2O_2 instead of molecular oxygen as it was shown for PSII without Ca^{2+} in OEC earlier.

Keywords: *photosystem II, oxygen-evolving complex, fluorescence induction kinetic, calcium, lanthanoides, terbium*

Сведения об авторах

Локтюшкин Алексей Владимирович – канд. биол. наук, ст. преподаватель кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-33-15; e-mail: *allokt@gmail.com*

Ловягина Елена Рудольфовна – канд. биол. наук, ст. научн. сотр. кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-33-15; e-mail: *elena.lovyagina@gmail.com*

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*