

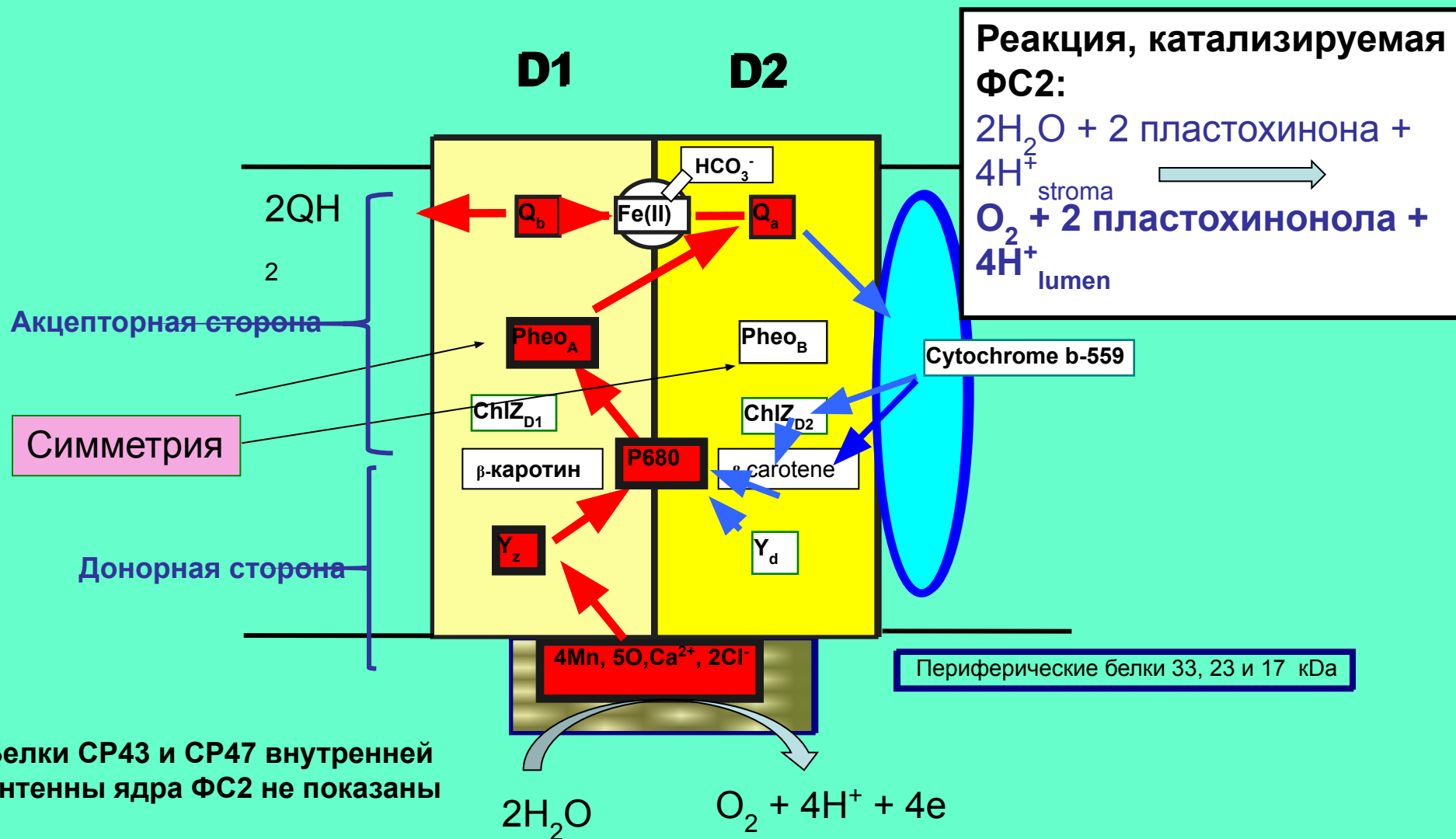
ТРАНСФОРМАЦИЯ ЭНЕРГИИ В ПРОЦЕССЕ ОКСИГЕННОГО ФОТОСИНТЕЗА

Д.б.н. Семин Борис Константинович

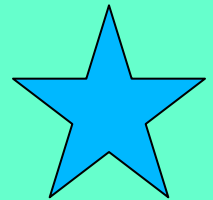
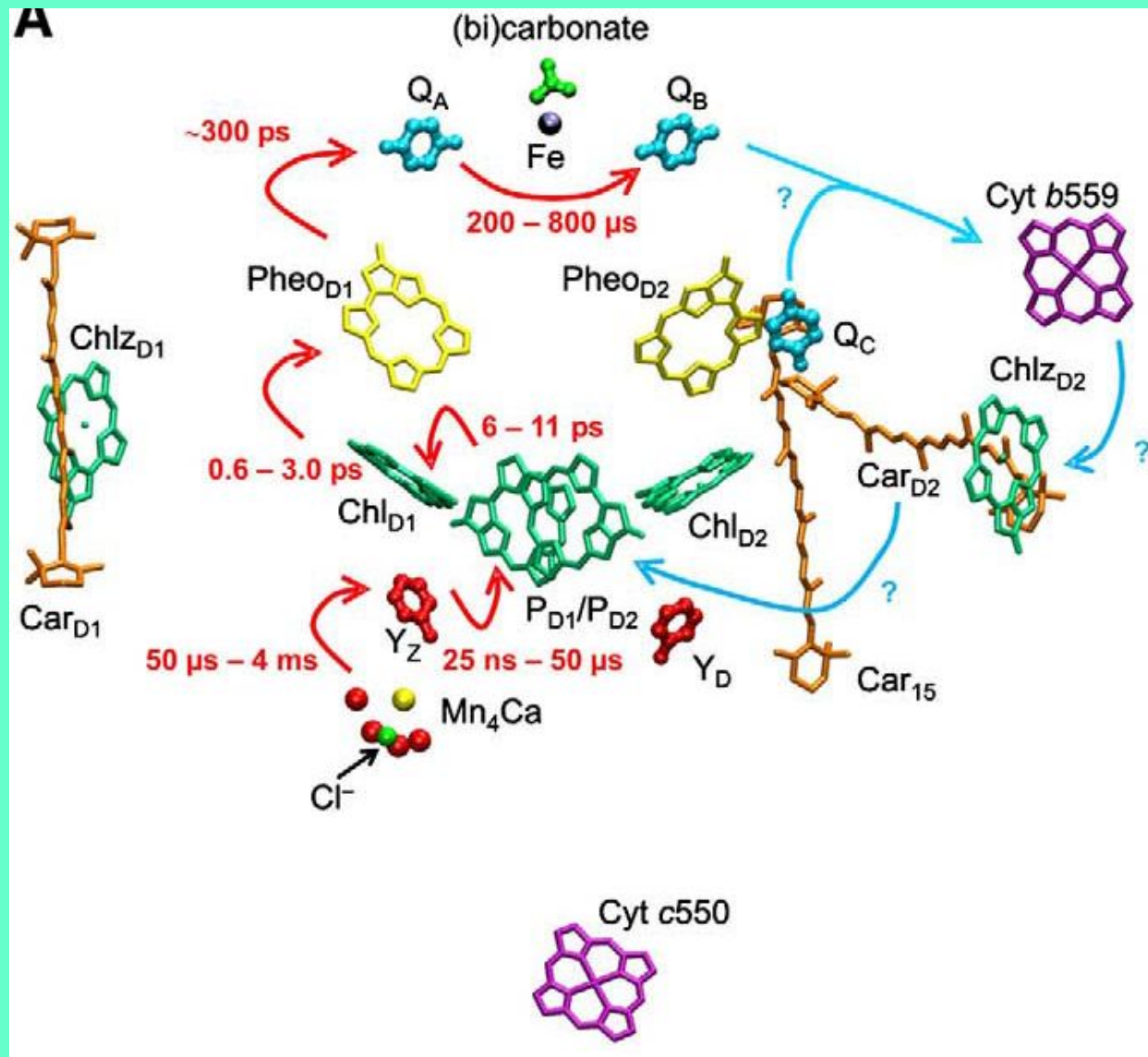
МЕХАНИЗМЫ ТРАНСФОРМАЦИИ ЭНЕРГИИ В ФОТОСИНТЕЗЕ

2016

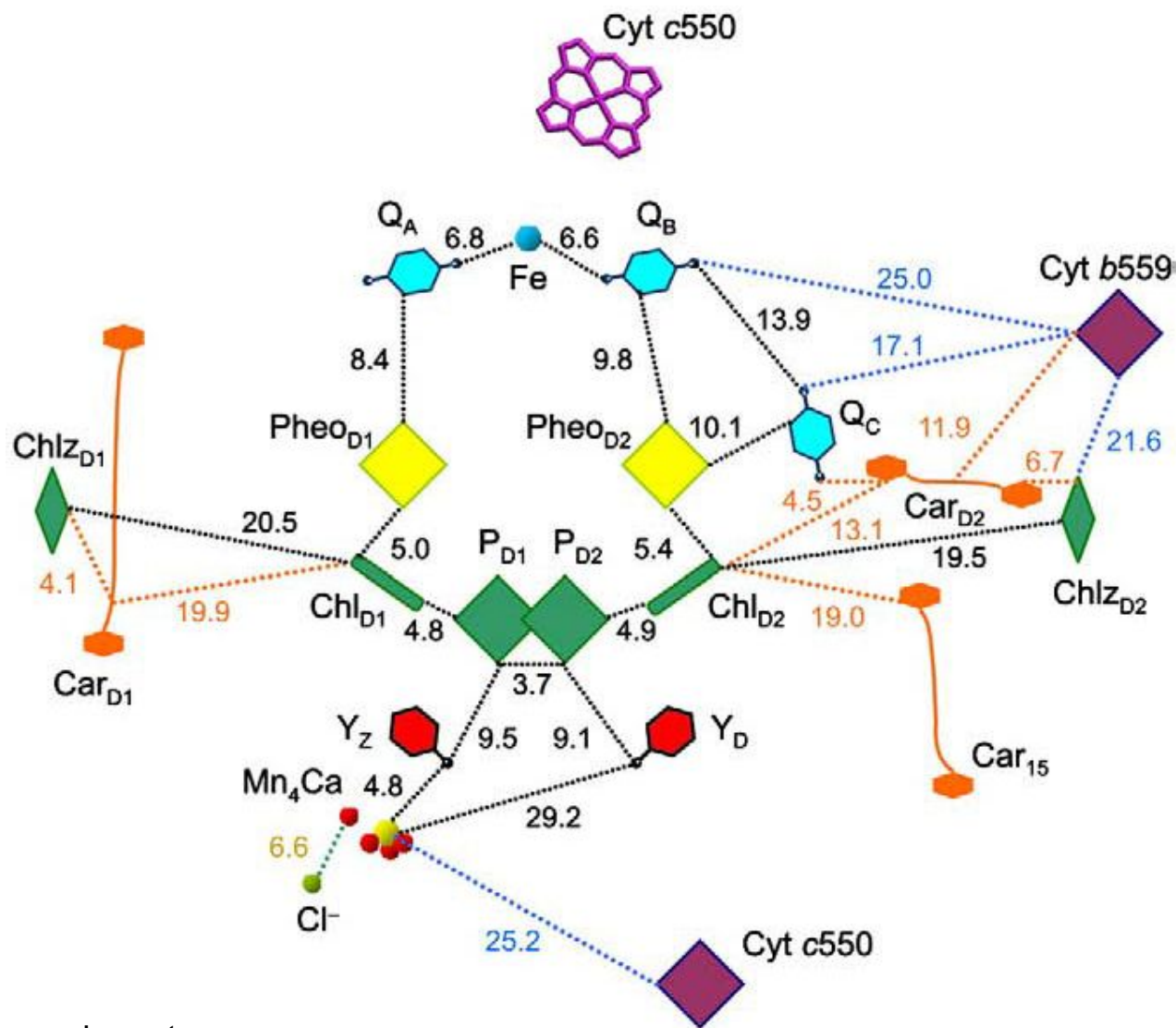
ЭЛЕКТРОН-ТРАНСПОРТНЫЕ КОМПОНЕНТЫ, КОФАКТОРЫ И РЕДОКС-AКТИВНЫЕ КОМПОНЕНТЫ В ЯДРЕ ФС2



ЭЛЕКТРОН-ТРАНСПОРТНЫЕ КОМПОНЕНТЫ, КОФАКТОРЫ И РЕДОКС-AКТИВНЫЕ КОМПОНЕНТЫ В ЯДРЕ ФС2



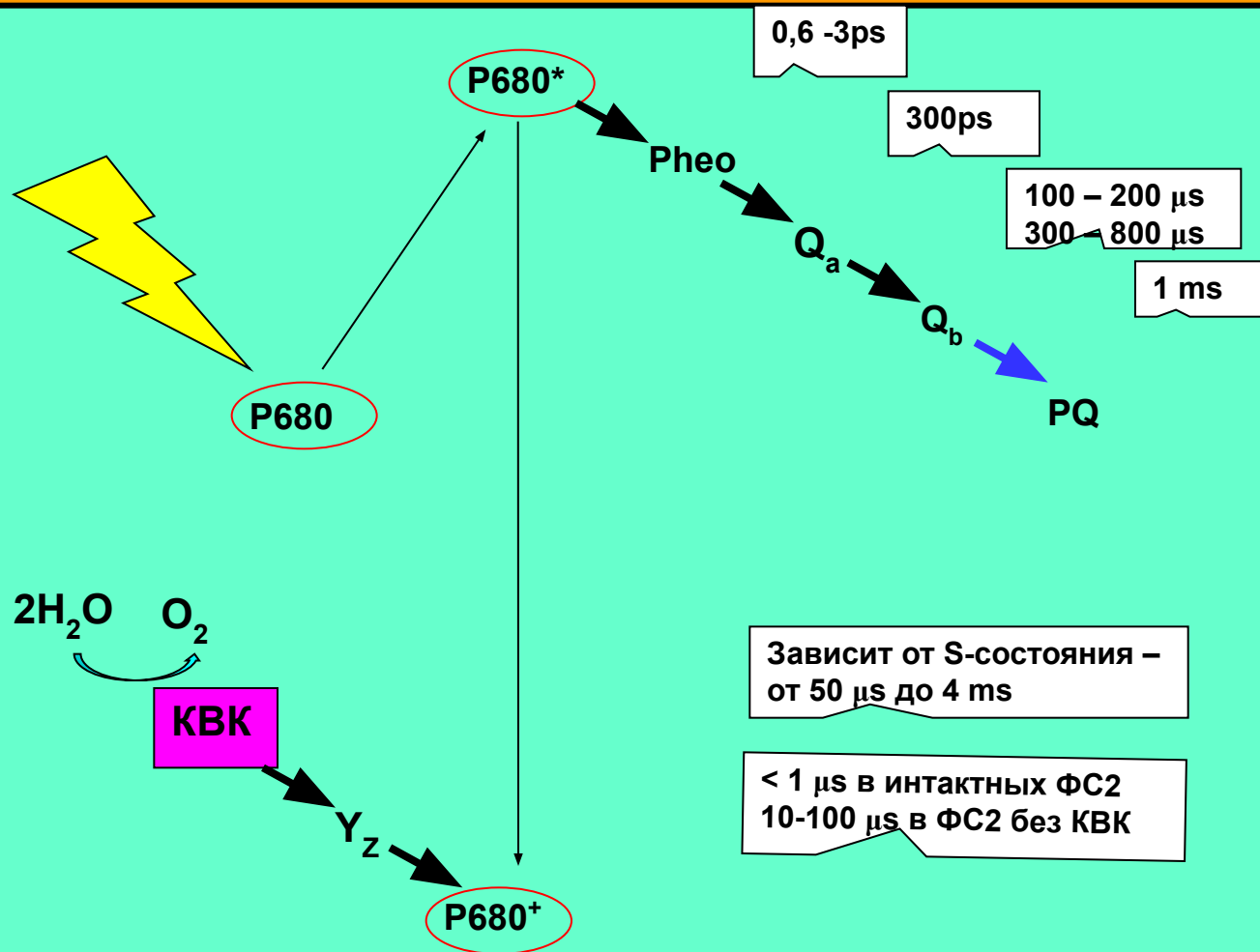
Расстояния между кофакторами в ФС2



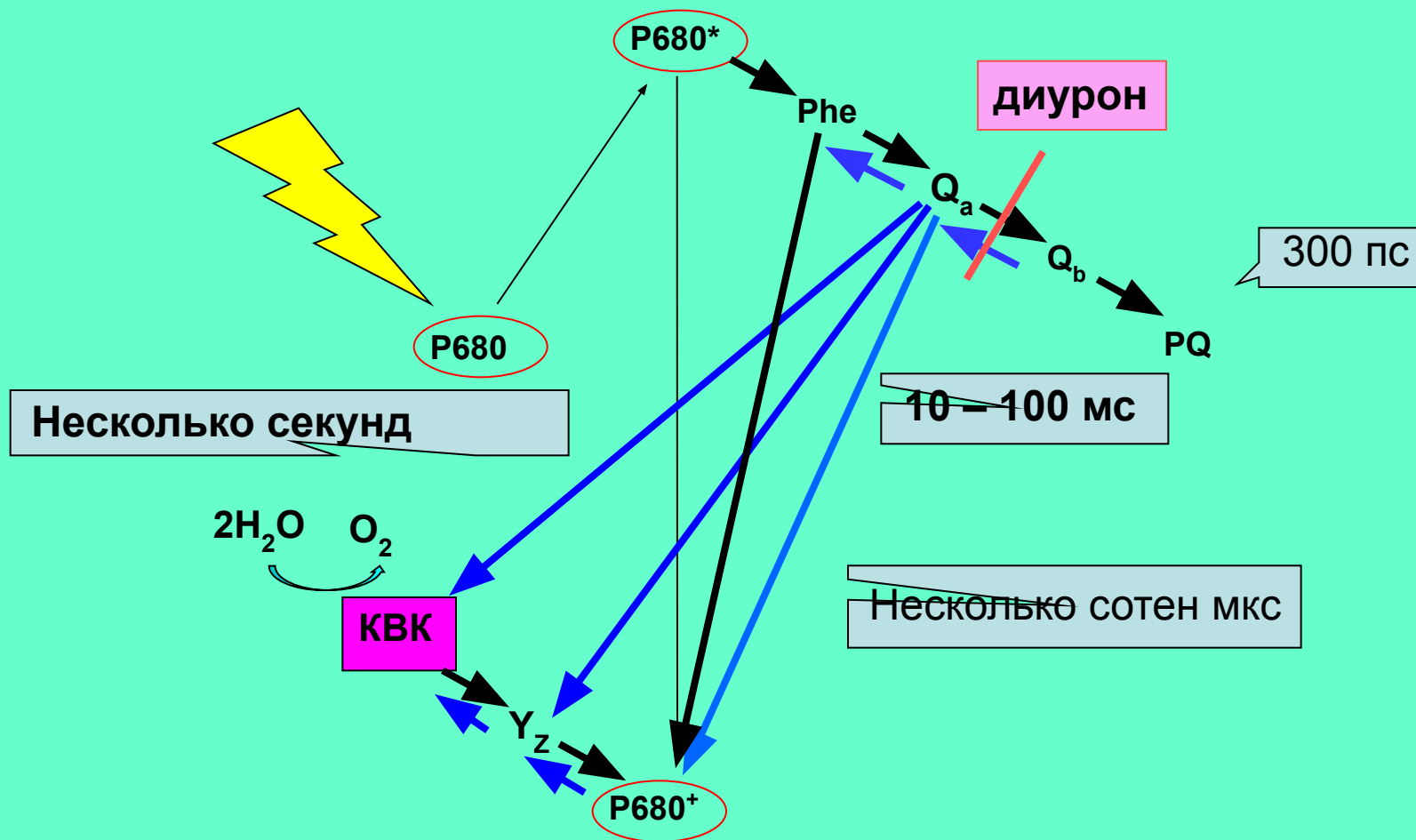
Müh et al., 2012

Thermosynechococcus elongatus

ВРЕМЕНА ПЕРЕНОСА ЭЛЕКТРОНА МЕЖДУ КОМПОНЕНТАМИ ЭТЦ

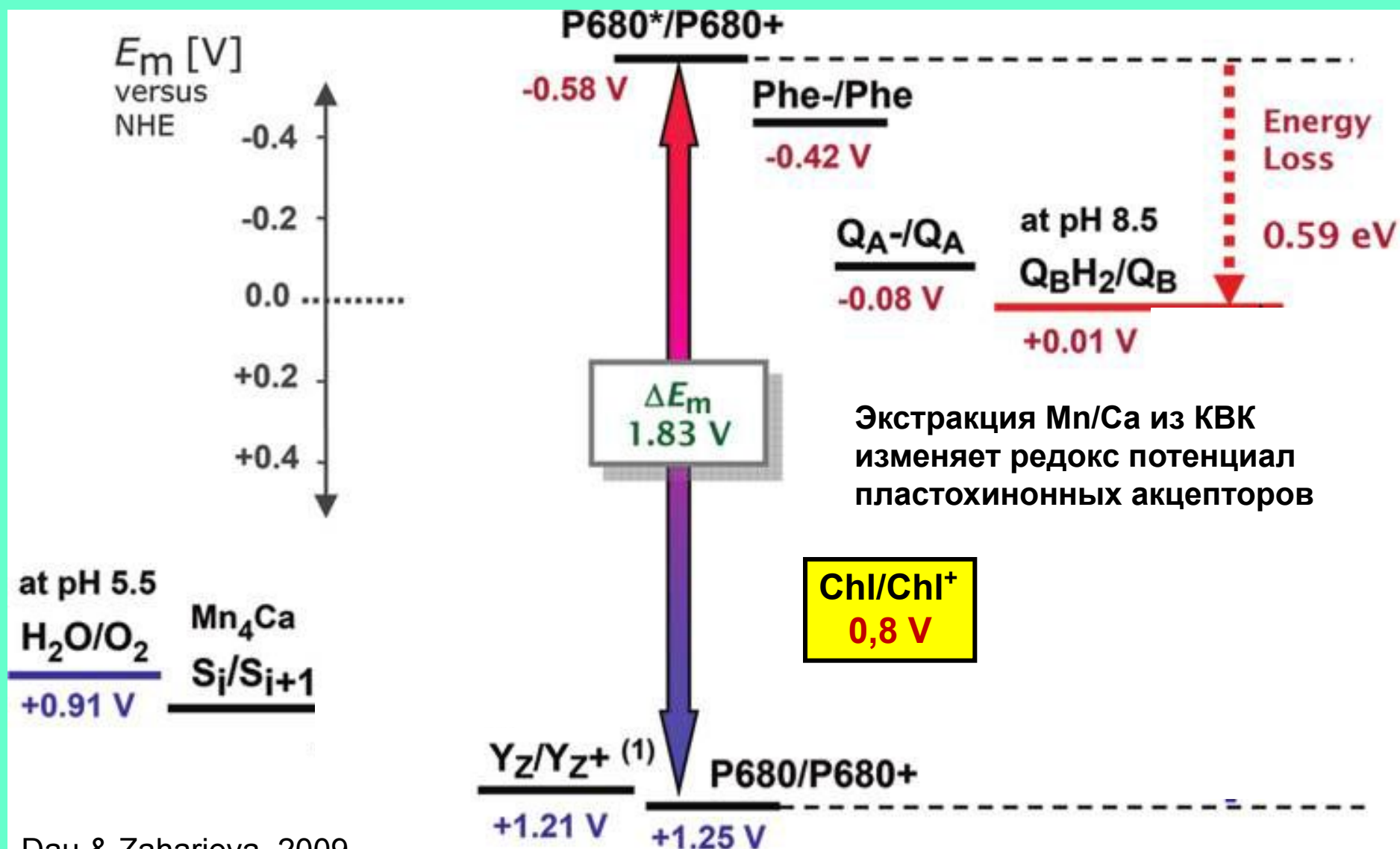


ВРЕМЕНА РЕКОМБИНАЦИИ ЗАРЯДОВ



Как для многих химических реакций, существует не только прямой перенос электрона, но и обратный (рекомбинация зарядов).

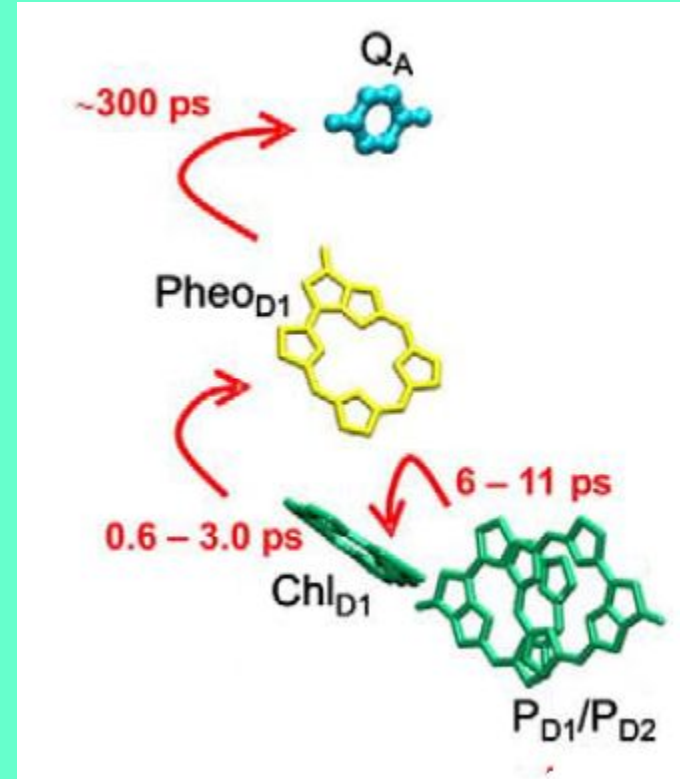
ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЕ ПОТЕНЦИАЛЫ



Электрон-транспортные компоненты ФС2. P680

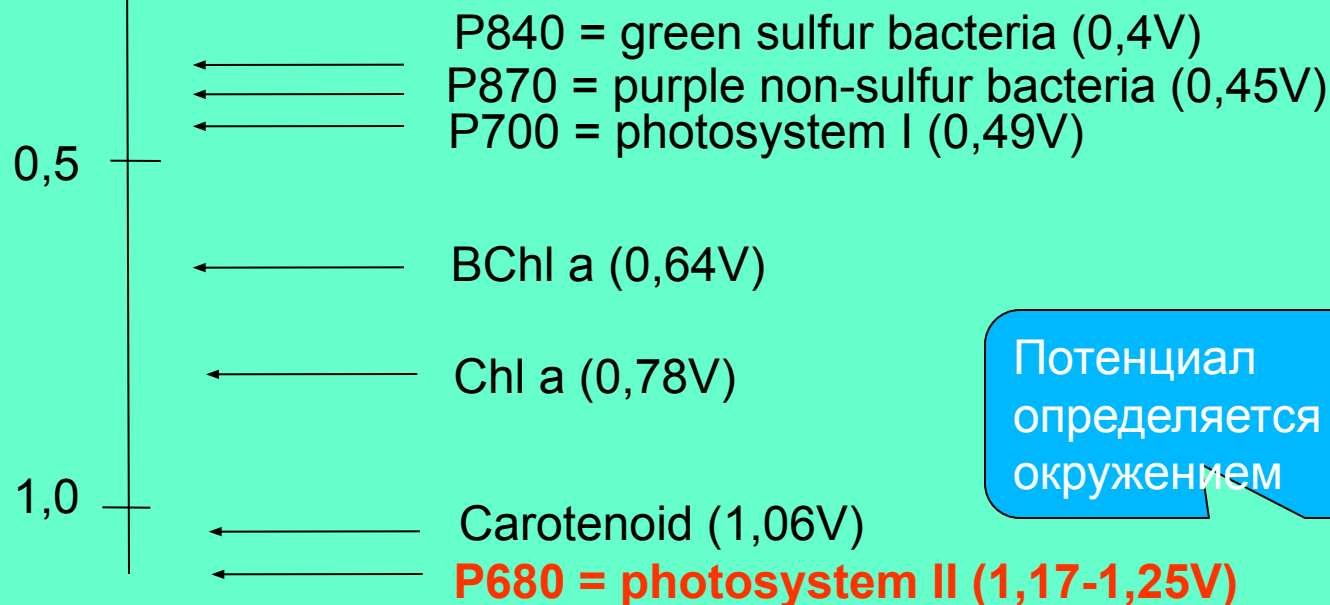
Разделение зарядов

1. Поглощение кванта света и возбуждение хлорофилла Chl_{D1} .
2. Восстановление Pheo_{D1} возбужденным хлорофиллом Chl_{D1} – 0,6 – 3 пс.
3. Восстановление хлорофилла Chl_{D1}^+ хлорофиллом P_{D1} – образование радикальной пары $\text{P}_{D1}^{\bullet+}\text{Pheo}_{D1}^{\bullet-}$ 6 – 11 пс.
4. Восстановление Q_A восстановленным феофитином $\text{Pheo}_{D1}^{\bullet-}$ и стабилизация радикальной пары $\text{P}_{D1}^{\bullet+}\text{Q}_A^{\bullet-}$ – 300 пс.



Электрон-транспортные компоненты ФС2. P680

Сравнение редокс потенциала первичного донора фотосистемы 2 с редокс потенциалами первичных доноров в других организмах, а также хлорофилла и каротиноида

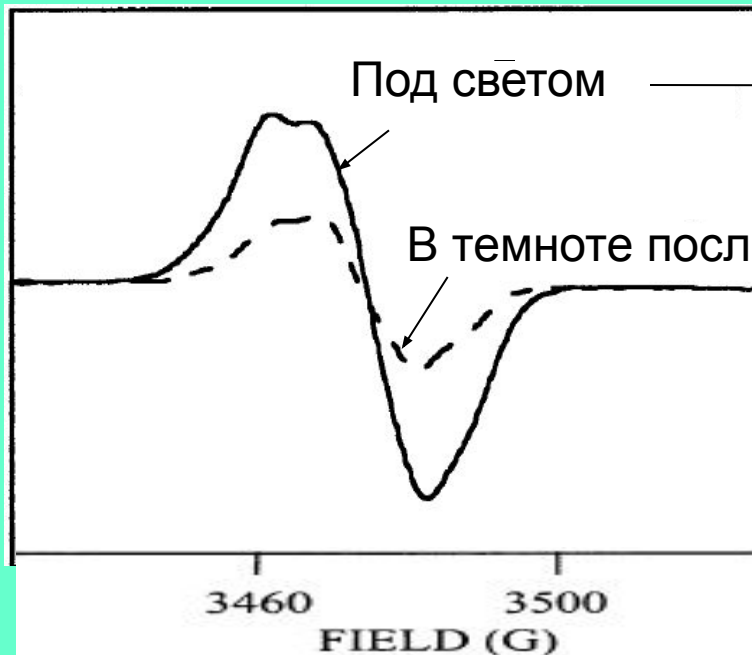


Потенциал
определяется
окружением

Электрон-транспортные компоненты ФС2. Тирозин Yz.

- ✂ Переносчик электрона между марганцевым кластером (КВК) и P680.
- ✂ Окислительно-восстановительный потенциал около 1.1 – 1.2 В.
- ✂ Расположен в позиции 161 полипептида D1.
- ✂ В окисленном состоянии регистрируется методом ЭПР: сигнал SIIvf (**very fast**, в интактной фотосистеме) или сигнал SII_f (**fast**, в фотосистеме с поврежденным КВК).
Сигналы ЭПР SII_{vf} и SII_f отличаются по времени затухания - микросекундный и миллисекундный временной диапазон соответственно.

Частицы ФС2 без марганца



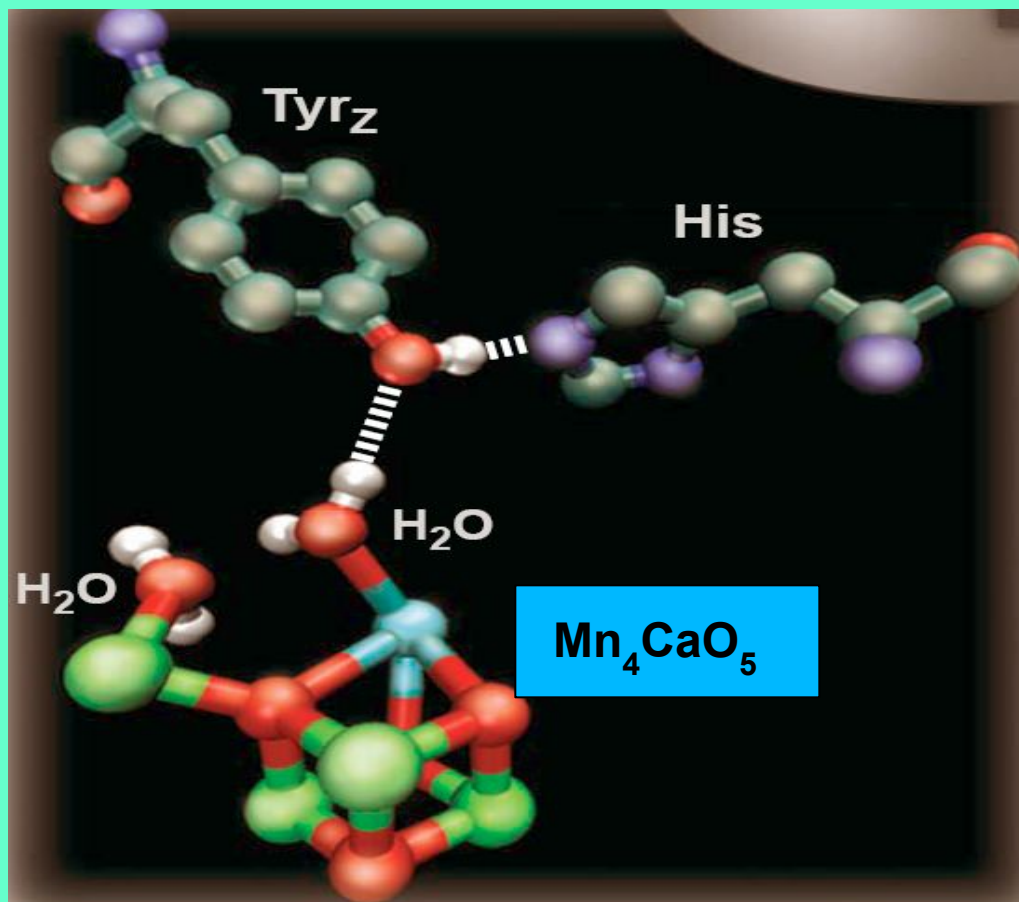
ЭПР сигнал SII (Yz^{•+} Yd[•])

Yd[•] сигнал ЭПР SII_s
(**slow**, время
затухания
часы)

Участие пластохинона - история

Электрон-транспортные компоненты ФС2. Тирозин Yz.

ТИРОЗИН Yz ОБРАЗУЕТ ВОДОРОДНУЮ СВЯЗЬ С ГИСТИДИНОМ D1-H190



Водородная связь: $> 2,6 \text{ \AA}$

Низкобарьерная
водородная связь:
 $2,45 - 2,65 \text{ \AA}$

[сильная короткая связь,
низкобарьерная водородная
связь
(low barrier hydrogen bond,
LBHB)]

Расстояние между донором и
акцептором водорода (TyrZ/
His190) в *Thermosynechococcus*
vulcanus $2.46 \text{ \AA}$

Электрон-транспортные компоненты ФС2.

Кислород-выделяющий комплекс (КВК)

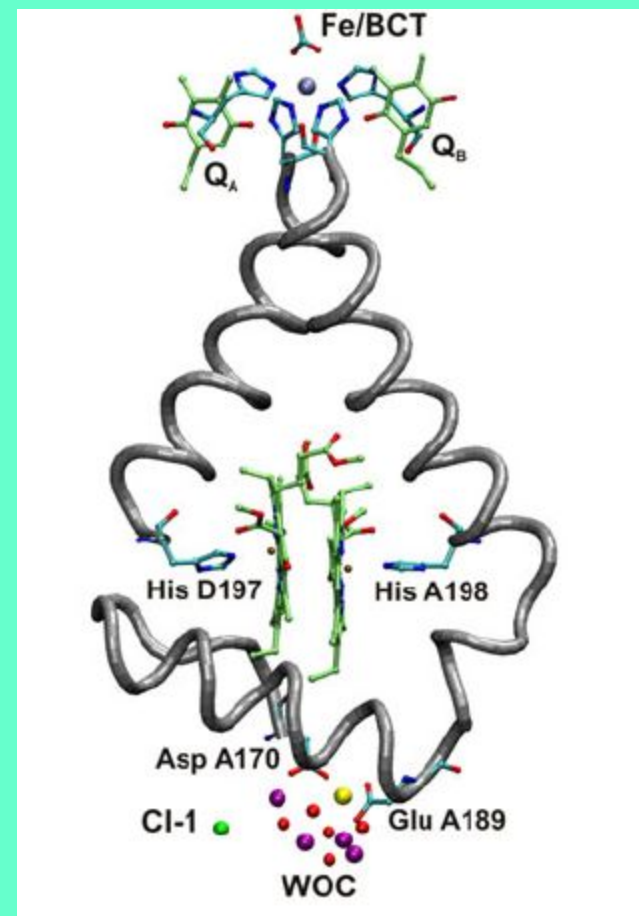
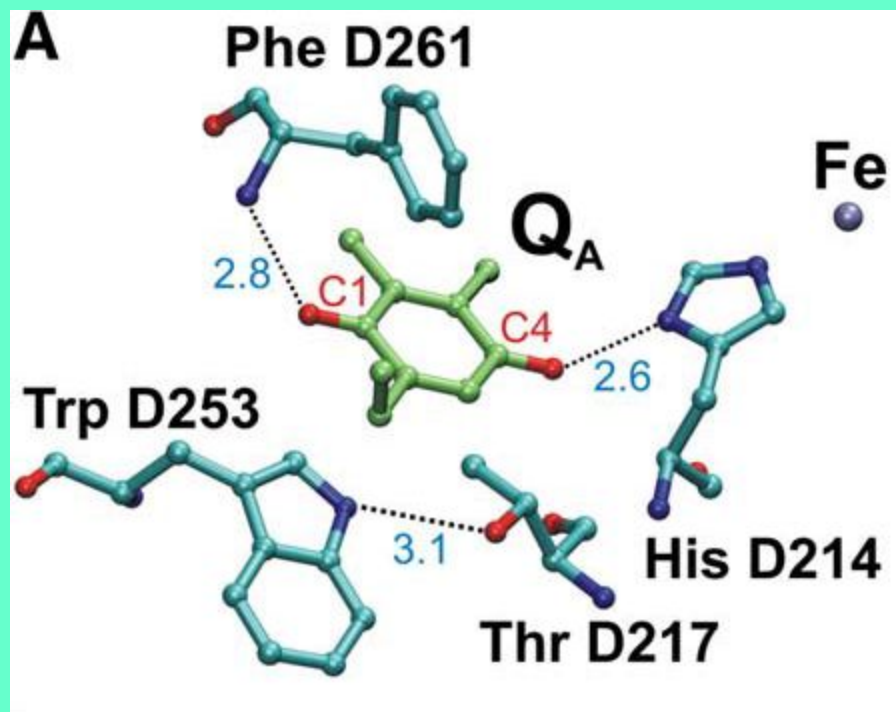
- Каталитический центр ФС2 окисляет воду и синтезирует молекулярный кислород.
- Содержит кластер, состоящий из 4 катионов Mn, 5 атомов кислорода и 1 катиона Ca^{2+} .
- В состав КВК входит также один или два аниона Cl^- .
- Расположен с внутренней стороны тилакоидной мембраны и закрыт периферическими белками 33, 24 и 16 kDa (кроме цианобактерий, в которых роль белка 24 kDa играет цитохром c550, не участвующий в электрон-транспортных реакциях).

Электрон-транспортные компоненты ФС2.

Акцепторная сторона

- Акцепторная сторона ФС2 включает в себя феофитин и пластохинонные акцепторы Q_A и Q_B . Перенос электрона осуществляется от P680 к Q_B .
- Феофитин.**
- Переносчик электрона от P680 к пластохинону Q_A – окисляет возбужденную форму P680* и восстанавливает Q_A .
Феофитин - хлорофилл а, не содержащий магния.
- Первичный пластохинонный акцептор Q_A .**
- Одноэлектронный акцептор, при двухэлектронном восстановлении (происходящем, например, при сильном освещении) покидает участок связывания.
- Редокс-потенциал чувствителен к различным воздействиям (увеличивается или уменьшается; сдвиг в положительную область может достигать 150 мВ): деструкция кислород-выделяющего комплекса, связывание гербицидов.
- Редокс потенциал не зависит от pH в пределах 5,5 – 7,5.
- Участок связывания с внешней стороны мембраны (стромальная сторона). В связывании принимает участие белок D2.

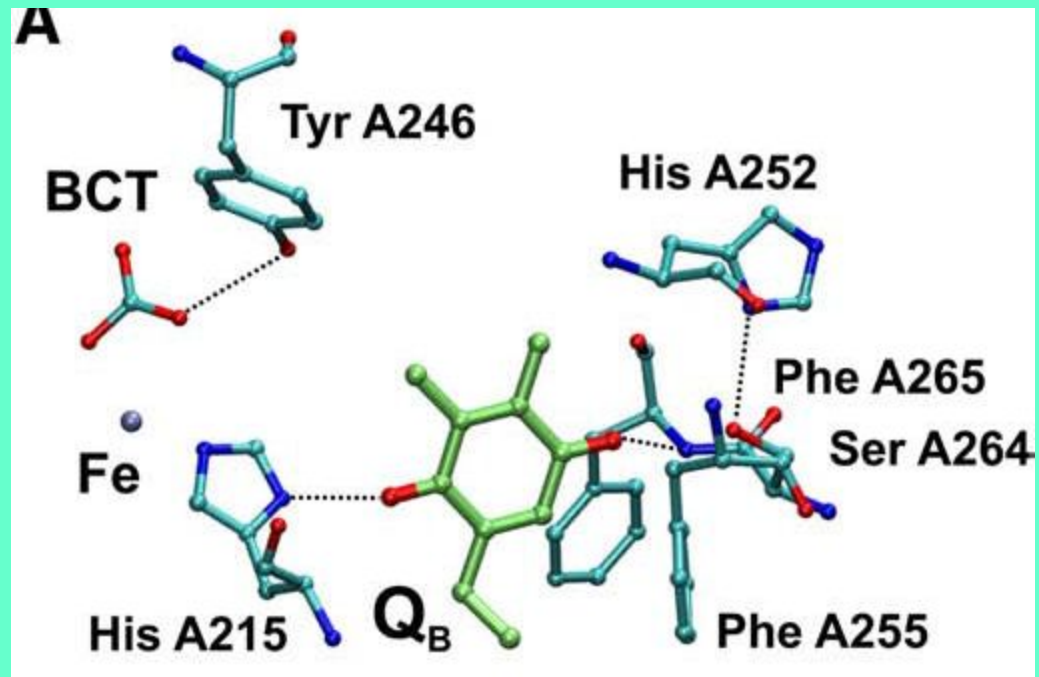
**Белковое окружение (белок D2) пластохинона Q_A в *T. elongatus*.
(Müh et al, 2012)**



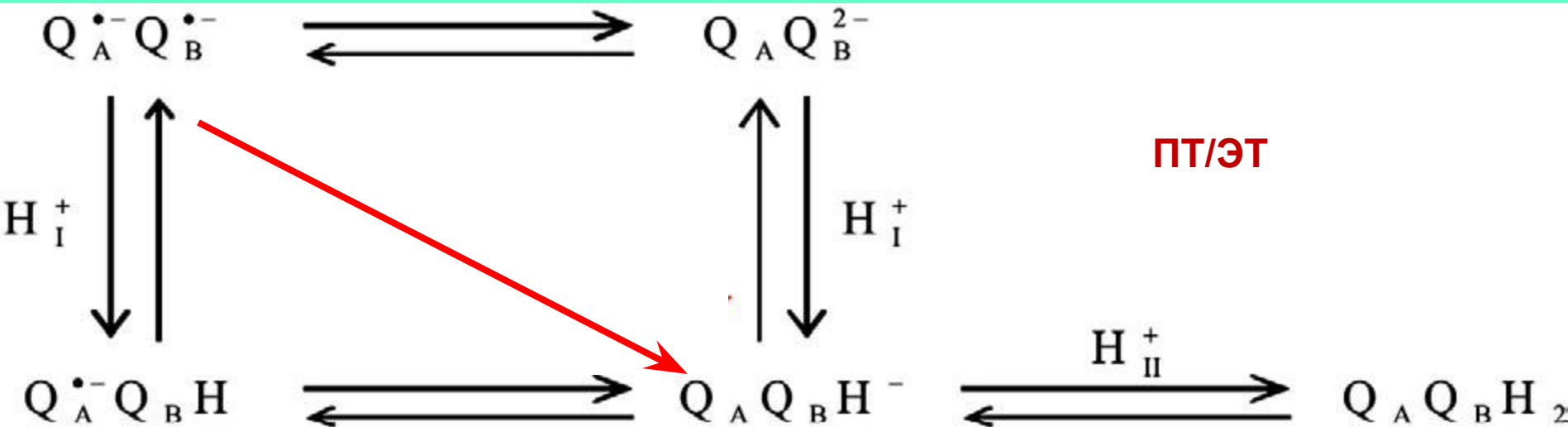
**Механизм влияния донорной стороны
на акцепторную**

Белковое окружение (белок D1) пластохинона Q_B в *T. elongatus*. (Müh et al, 2012)

- Двухэлектронный акцептор, при двухэлектронном восстановлении покидает участок связывания и замещается молекулой окисленного пластохинона из пула пластохинонов.
- Восстановление пластохинона сопряжено с его протонированием (протонный канал).
- Участок связывания с внешней стороны мембраны (стромальной стороны). В связывании принимает участие **белок D1**.



Восстановление и протонирование Q_B



Возможные реакции переноса второго электрона и двух протонов к Q_B (Müh et al, 2012)

Красная стрелка – наиболее вероятный путь

Экспериментальные данные показывают, что удаление **бикарбоната** блокирует протонирование Q_B^{2-} (или $Q_B H^-$), тем самым ингибируя высвобождение восстановленного пластохинона в мембрану.

Эти результаты позволяют предполагать, что бикарбонат участвует в протонировании Q_B .

РЕДОКС-АКТИВНЫЕ КОМПОНЕНТЫ ФС2, НЕ УЧАСТВУЮЩИЕ В РАБОТЕ ОСНОВНОЙ ЭТЦ

- **Цитохром b-559.**
- Обязательный компонент реакционного центра ФС2.
- Расположен со стороны полипептида D2.
- Функция неизвестна (возможно, защита от фотоингибирования).
- На 1 РЦ приходится 1 молекула цитохрома.
- Состоит из 2х субъединиц - α (9 kDa) и β (4kDa) в стехиометрии 1:1
- Гем связан между субъединицами двумя остатками гистидина (по одному на субъединицу).
- Потенциал – существует 3 формы цитохрома: высокопотенциальный 370-475 мВ (в нативных ФС), среднепотенциальный 200-250 мВ и низкопотенциальный – 0 – 80 мВ (в поврежденных ФС).
- Механизм изменения потенциала цитохрома: (1) изменения во взаимной ориентации плоскостей связывающих гистидинов; (2) изменения в протонировании и водородных связях лигандов; (3) изменение полярности среды вокруг гема; (4) изменения в составе лигандов.
- Высокопотенциальная форма цитохрома нестабильна и трансформируется в низкопотенциальную при различных воздействиях на КВК.

- **Хлорофиллы Z_{D1} и Z_{D2} .**

Функция неизвестна (возможно, защита от фотоингибирования).

Связаны соответственно с полипептидами D1 и D2.

Окисляется (?) первичным донором при низких температурах и является окислителем для цитохрома b-559. Окисленные формы регистрируется с помощью ЭПР.

- **Каротины.**

- **Тирозин Y_D .**

Позиция 160 в белке D2.

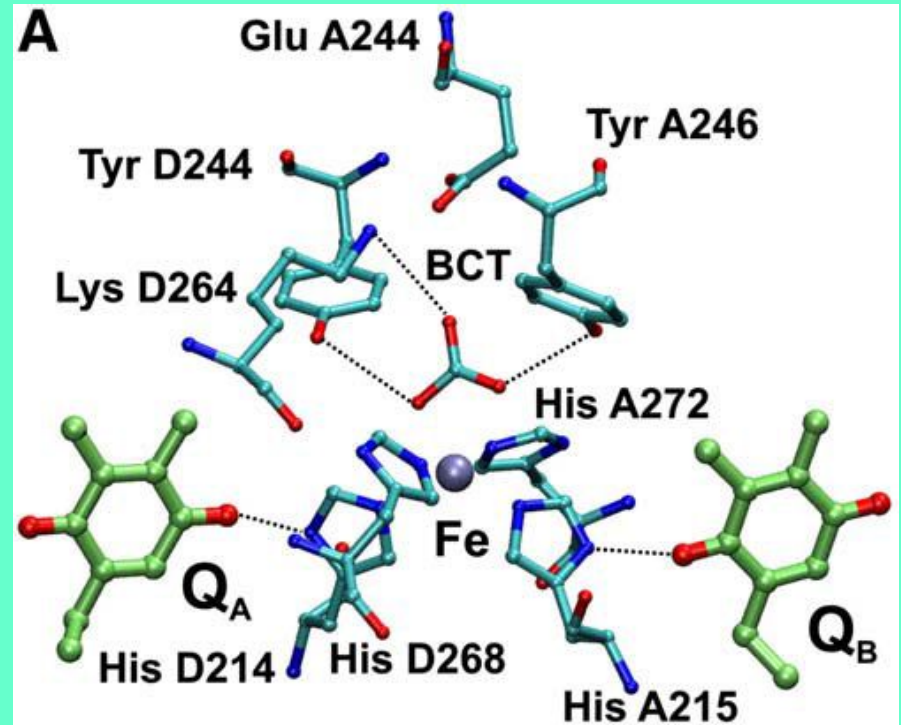
При окислении появляется сигнал ЭПР, идентичный сигналу ЭПР для тирозина Y_z . Сигнал Slls (slow) имеет время полужизни несколько часов.

Функция неизвестна (возможно, окисление марганцевого кластера в S0 и восстановление марганца в S2 и S3 (около 1с), что обеспечивает стабилизацию марганцевого кластера и перевод его в стабильное состояние S1).
Редокс-потенциал 0.72 – 0,76 V.

Кофакторы ФС2

- **Негемовое железо.**
- Катион Fe(II), связанный гистидинами трансмембранных спиралей D, E полипептидов D1 и D2.
- Расположен между хинонами Q_A и Q_B , но не окисляется / восстанавливается при переносе электрона.
- Аксиальным лигандом является ион бикарбоната.
- Редокс потенциал
450 - 350 mV между pH 6 и 8

ВСТ - бикарбонат



(Müh et al, 2012)

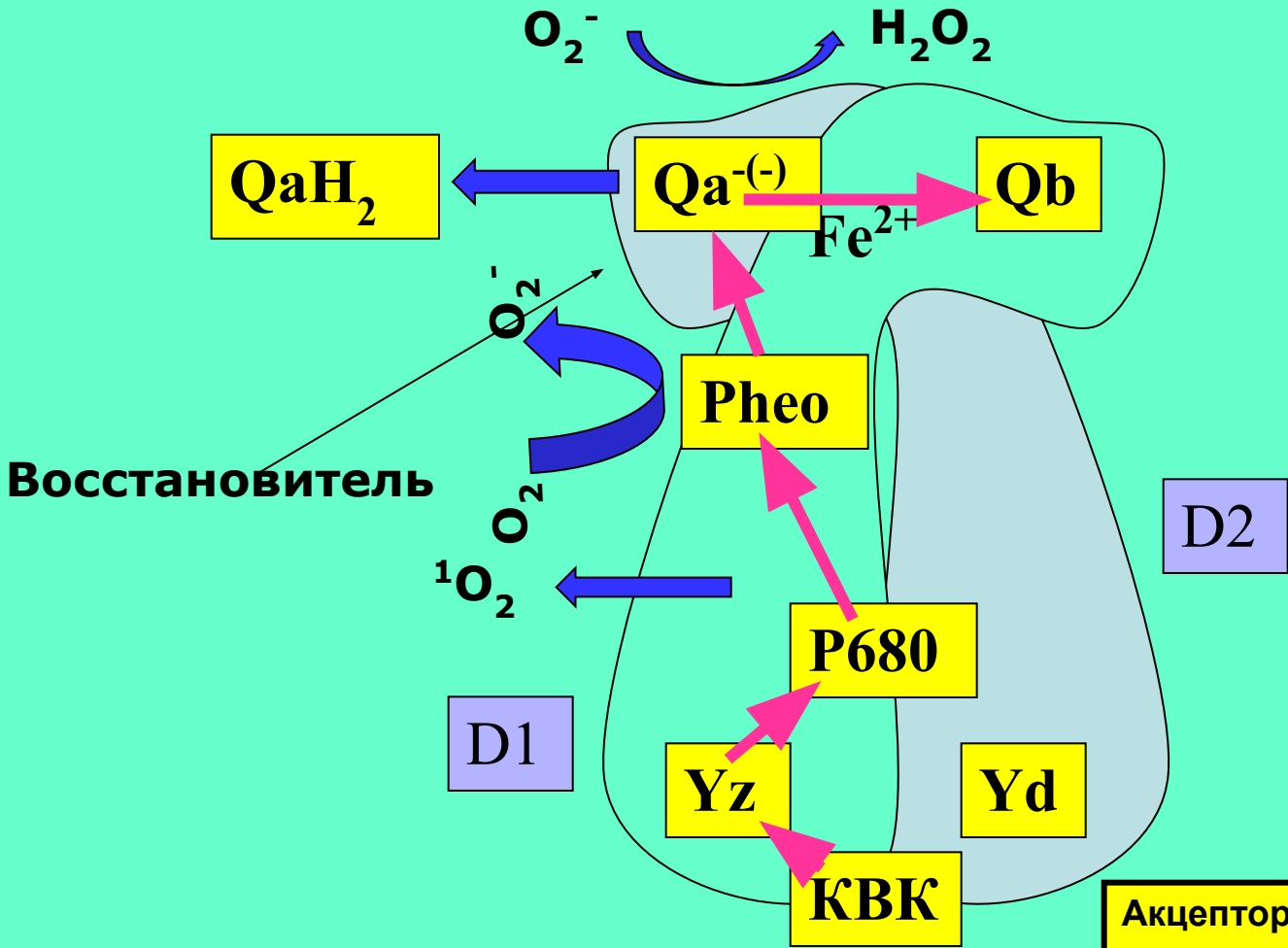
- **Ион бикарбоната HCO_3^- .**

- Удаление бикарбоната приводит к ингибированию переноса электрона от Q_A и Q_B .
- Возможно, что бикарбонат участвует в протонировании Q_B .
- Связан с негемовым железом, предоставляя два лиганда для катиона железа.
- Имеются также данные о влиянии бикарбоната на донорную сторону (фотоактивация).

ФОТОИНГИБИРОВАНИЕ

- Свет может приводить к уменьшению скорости выделения кислорода и электронного транспорта. Данные эффекты могут быть следствием включения регуляторного механизма (обратимый процесс) или следствием необратимого разрушения ФС2. Последний процесс называется фотоингибированием.
- Различают два типа фотоингибирования: донорное и акцепторное.
- Фотоингибирование донорного типа наблюдается при повреждении кислород-выделяющего комплекса.
- К фотоингибированию донорного типа относится фотоингибирование, объясняемое марганцевой гипотезой.
- Фотоингибирование акцепторного типа наблюдается при ингибировании процесса восстановления пластохинона Q_B .
- При фотоингибировании в первую очередь повреждается белок D1. Этот белок имеет наивысшую скорость обмена среди всех субъединиц ФС2.
- В растительных клетках работает система синтеза белка D1 и замены разрушенного белка D1 новым, поэтому регистрируемый уровень фотоингибирования (например, скорость выделения кислорода) зависит от соотношения скоростей разрушения и восстановления ФС2.

- Фотоингибирование наблюдается, когда скорость восстановления белка меньше скорости его разрушения. Поэтому, для корректной оценки скорости фотоингибирования *in vivo* необходимо добавлять ингибитор синтеза белка, чтобы подавить процесс реконструкции ФС2.
- Фотоингибирование может быть результатом генерации и действия активных форм кислорода (АФК; синглетный кислород, супероксидный анион-радикал, перекись водорода и гидроксильный радикал) и/или появления долгоживущих сильных окислителей ($P680^{+}$, YZ^{+})
- Содержание кислорода внутри тилакоидной мембраны – 2-10 $O_2/1000$ Хл (Ivanov et al. 2007).



Акцепторное фотоингибирование имеет место при ингибировании процесса восстановления Q_B (сильный свет, гербициды и т.д.)

ФОТОИНГИБИРОВАНИЕ АКЦЕПТОРНОГО ТИПА

Синглетный кислород

Синглетный кислород считается одной из основных причин фотоингибирования .

Механизм образования синглетного кислорода в ФС2: молекула O_2 в нормальном триплетном состоянии реагирует с молекулой хлорофилла, находящейся в триплетном состоянии. В результате образуется хлорофилл в синглетном состоянии и кислород в синглетном возбужденном состоянии.

Триплетное состояние хлорофилла может появиться в результате: а) спонтанного изменения спина хлорофилла (intersystem crossing); б) в результате рекомбинации зарядов при увеличении времени жизни восстановленного феофитина.

На возможность образования синглетного кислорода при рекомбинации зарядов влияет также состояние КВК.

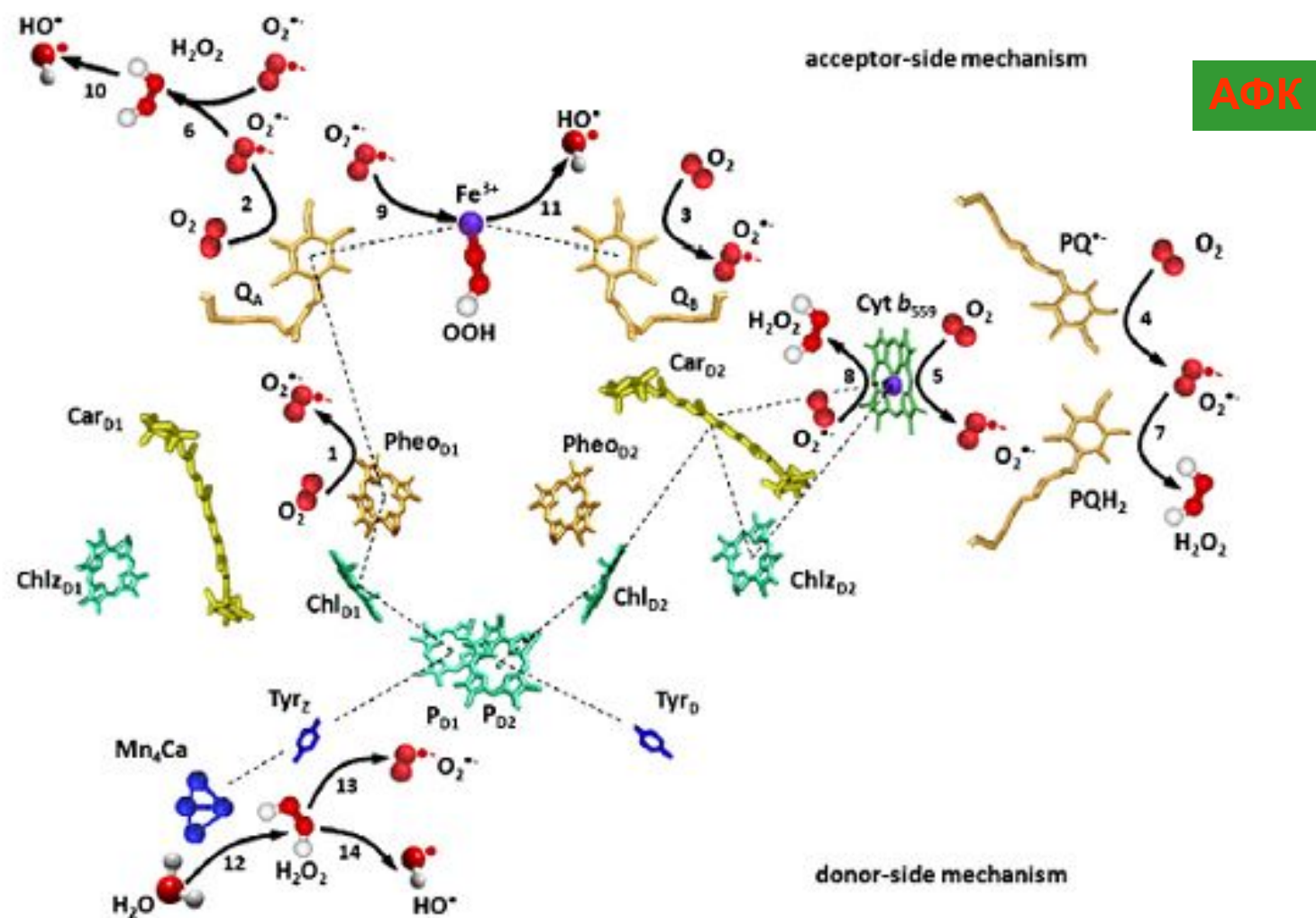


Fig. 3. ROS production on the electron acceptor and the electron donor side of PSII. On the electron acceptor side of PSII, the one-electron reduction of molecular oxygen by pheophytin (Pheo) (reaction 1), tightly bound plastoquinone (Q_A) (reaction 2), loosely bound plastoquinone (Q_B) (reaction 3), free plastoquinone (PQ) (reaction 4) and cytochrome b_{559} (cyt b_{559}) (reaction 5) results in the formation of superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$). Superoxide anion radical is reduced either by another $O_2^{\cdot-}$ (reaction 6) or plastoquinol (PQH₂) (reaction 7) to free hydrogen peroxide (H_2O_2). The interaction of $O_2^{\cdot-}$ with the heme iron of cyt b_{559} (reaction 8) or the non-heme iron (reaction 9) forms the ferric-hydroperoxo intermediate. The protonation of the proximal oxygen of the ferric-hydroperoxo intermediate by the proton released from the heme-binding histidine of cyt b_{559} causes the formation of H_2O_2 . The reduction of H_2O_2 by free metals such as Fe^{2+} or Mn^{2+} (reaction 10) or the reduction of the ferric-hydroperoxo intermediate by the non-heme iron (reaction 11) form hydroxyl radical ($HO^{\cdot}$). On the electron donor side of PSII, the two-electron oxidation of water results in the formation of H_2O_2 (reaction 12). The one-electron oxidation of H_2O_2 by tyrosine residue (Tyr_Z) results in the formation of $O_2^{\cdot-}$ (reaction 13). One-electron reduction of H_2O_2 by free Mn^{2+} released from the manganese complex forms $HO^{\cdot}$ (reaction 14). The arrangement of cofactors is based on three-dimensional crystal structure of PSII from thermophilic cyanobacteria *Thermosynechococcus elongatus* [29].

Сигнальная система с участием активных форм кислорода

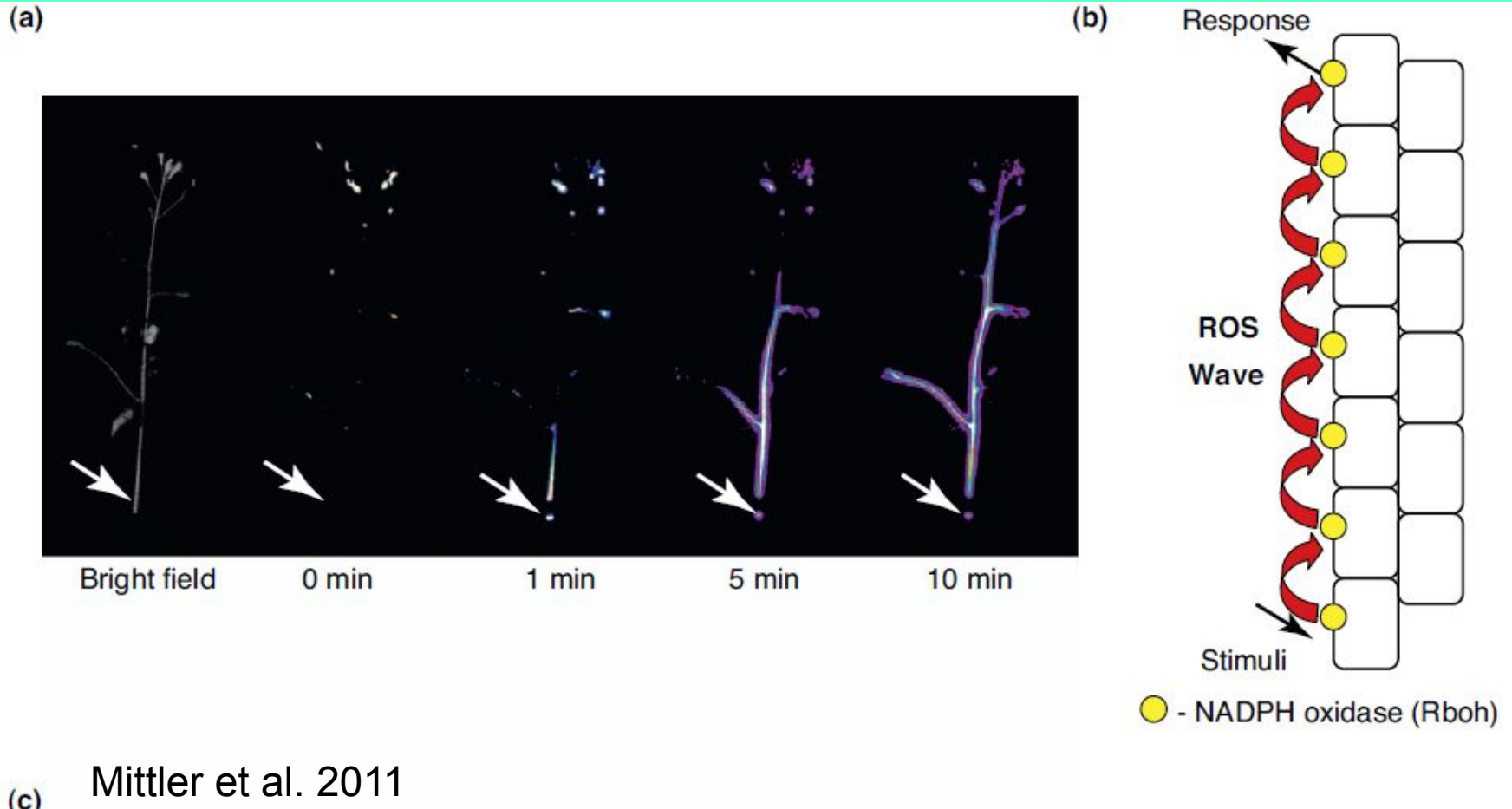
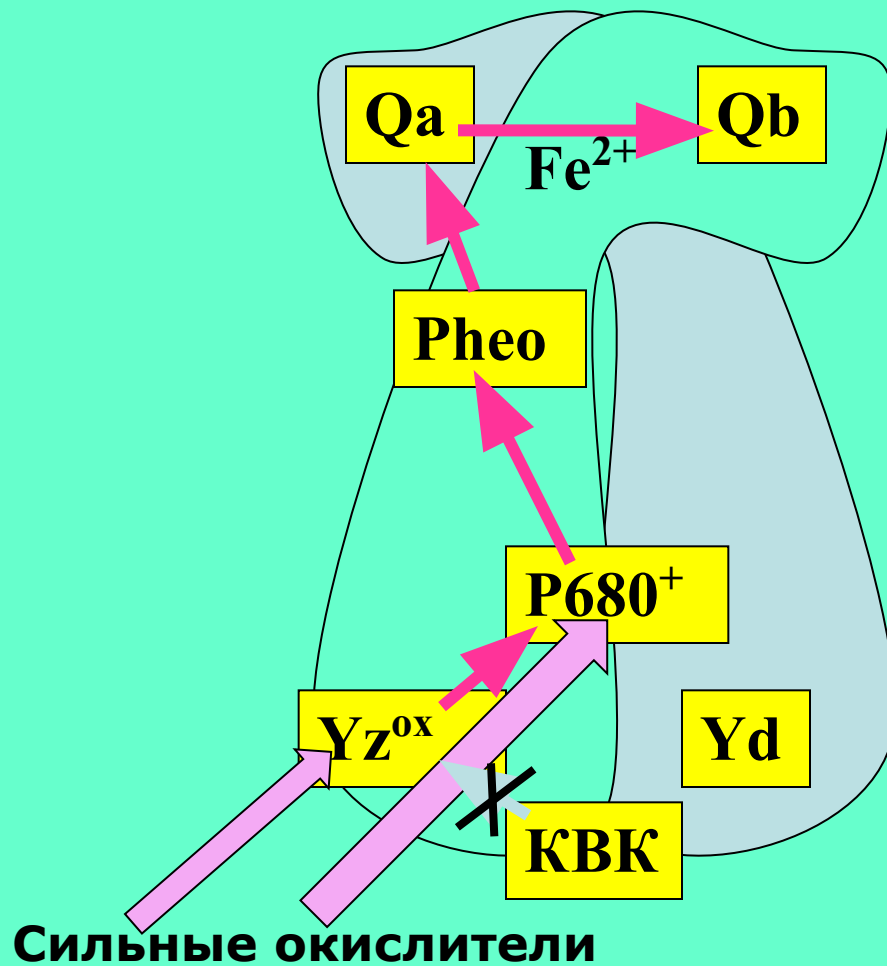


Figure 1. Dynamics and specificity in ROS signaling. (a) Time-lapse imaging of a ROS wave propagating through an *Arabidopsis* plant in response to wounding. Wounding site is indicated with a white arrow. Imaging of the ROS wave was obtained using a luciferase reporter gene fused to the promoter of the zinc finger protein ZAT12 as described in [6]. (b) Model for the extracellular propagation of the ROS wave [6]. Each cell along the path of the wave activates its NADPH oxidase (RbohD) and produces ROS in an autonomous manner resulting in an auto-propagating ROS wave. (c) Different models for ROS signaling specificity. Different signals (A, B, C, D) are transmitted between cells, or between different organelles within a cell, via ROS and other signaling pathways such as calcium, MAPK pathways and others.

ФОТОИНГИБИРОВАНИЕ.

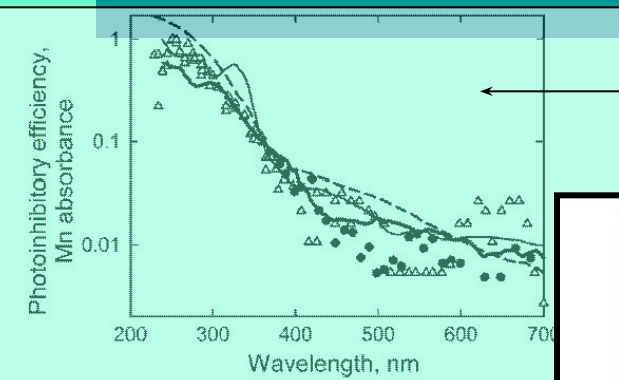
Донорное.



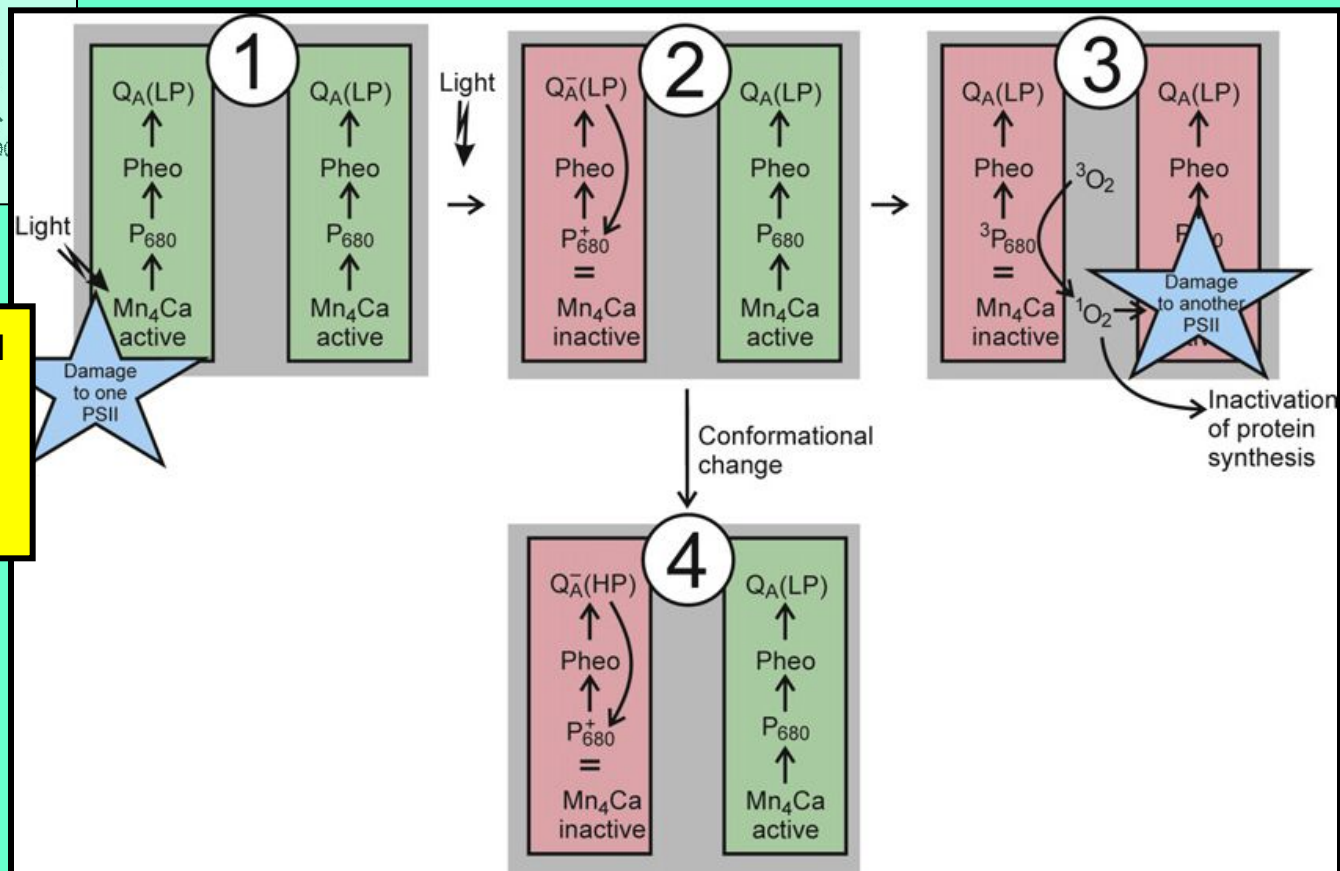
ФОТОИНГИБИРОВАНИЕ.

Марганцевая гипотеза.

Спектр действия фотоингибирования



Марганцевый механизм фотоингибирования работает, по-видимому, только в области УФ



ФОТОИНГИБИРОВАНИЕ.

ЗАЩИТА ОТ ФОТОИНГИБИРОВАНИЯ.

Синтез белка D1.

Замена полипептида D1 в реакционном центре ФС2.

Обмен этого белка в растениях:

- **0,5 – 1 час при сильном свете;**
- **10 часов при нормальном освещении.**

Однако, активные формы кислорода, появляющиеся при фотоингибировании, могут инактивировать механизм трансляции белков и, таким образом, смещать равновесие между скоростью инактивации белка D1 и скоростью его синтеза.

Синтез $\longrightarrow$ D1 $\longrightarrow$ распад

Table 1

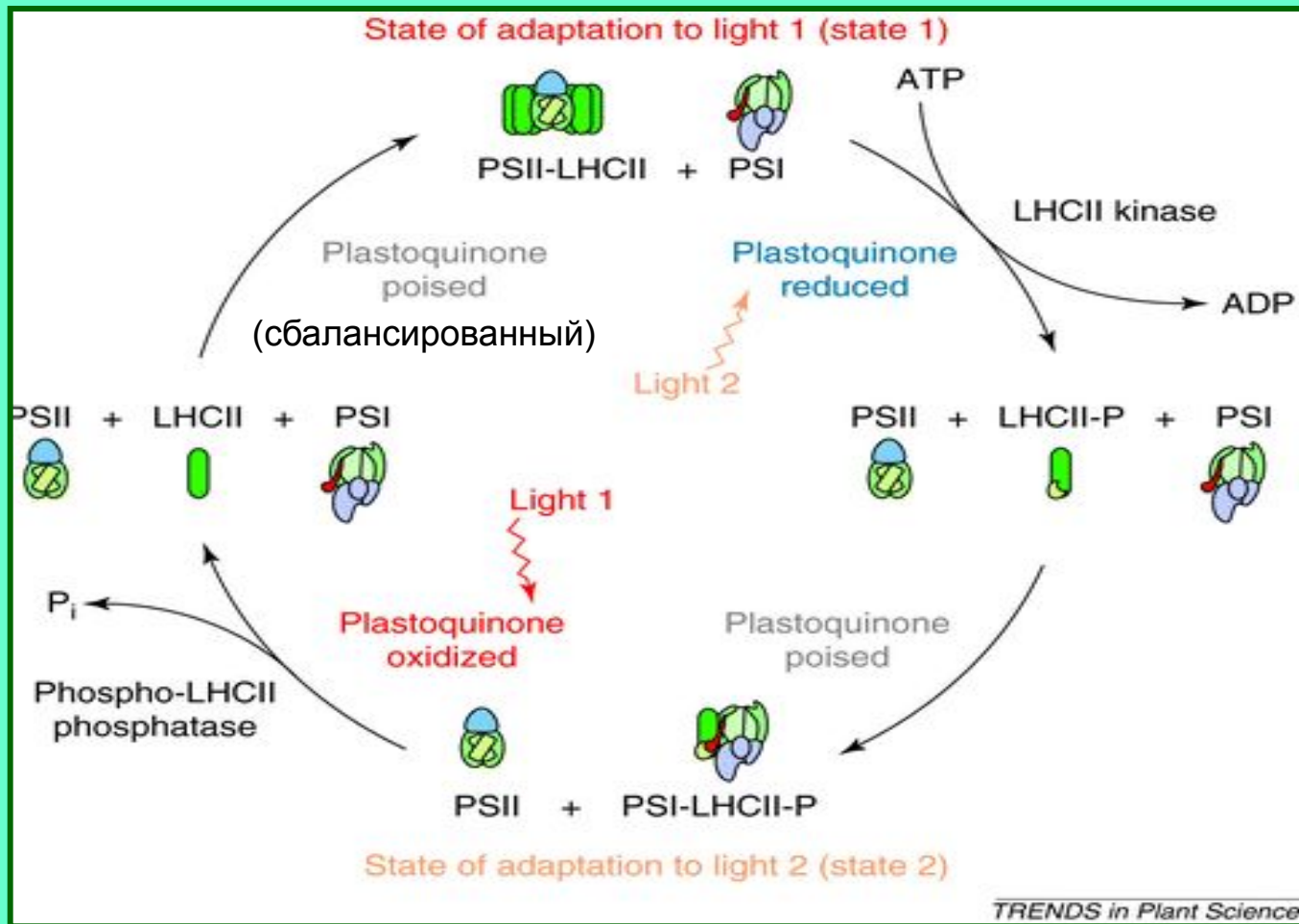
Comparison of the half-life times of PSI and PSII proteins in wild-type and SCP-less strains. The half-life times were calculated from the decrease in the percentage of unlabeled protein correcting for the increase in unlabeled protein shortly after the start of labeling that occurred for the longer-lived polypeptides. Listed are the average results of two independent experiments $\pm$ error.

Strains	Half-life time (h)	
	Wild-type	SCP-less
PsaA	40 ± 7	50 ± 4
PsaB	40 ± 7	50 ± 4
PsaD	75 ± 7	50 ± 7
PsaE	70 ± 7	53 ± 4
PsaF	50 ± 7	40 ± 2
PsaL	30 ± 1	30 ± 6
PsbA (D1)	<1	<1
PsbB (CP47)	11 ± 2.5	10.5 ± 1
PsbC (CP43)	6.5 ± 1.5	6 ± 0.5
PsbD (D2)	3.3 ± 1	3 ± 0.3

ФОТОИНГИБИРОВАНИЕ.

ЗАЩИТА ОТ ФОТОИНГИБИРОВАНИЯ.

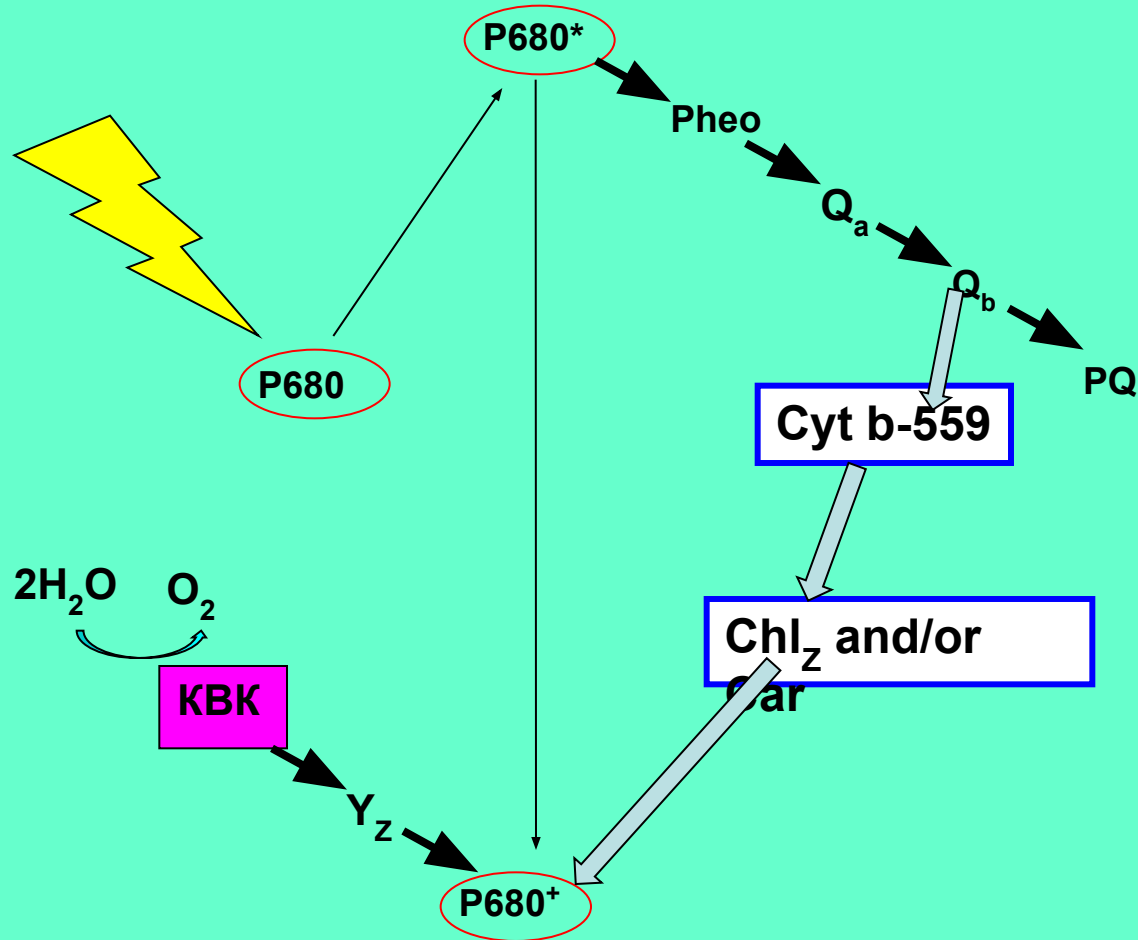
Фосфорилирование ССК2.

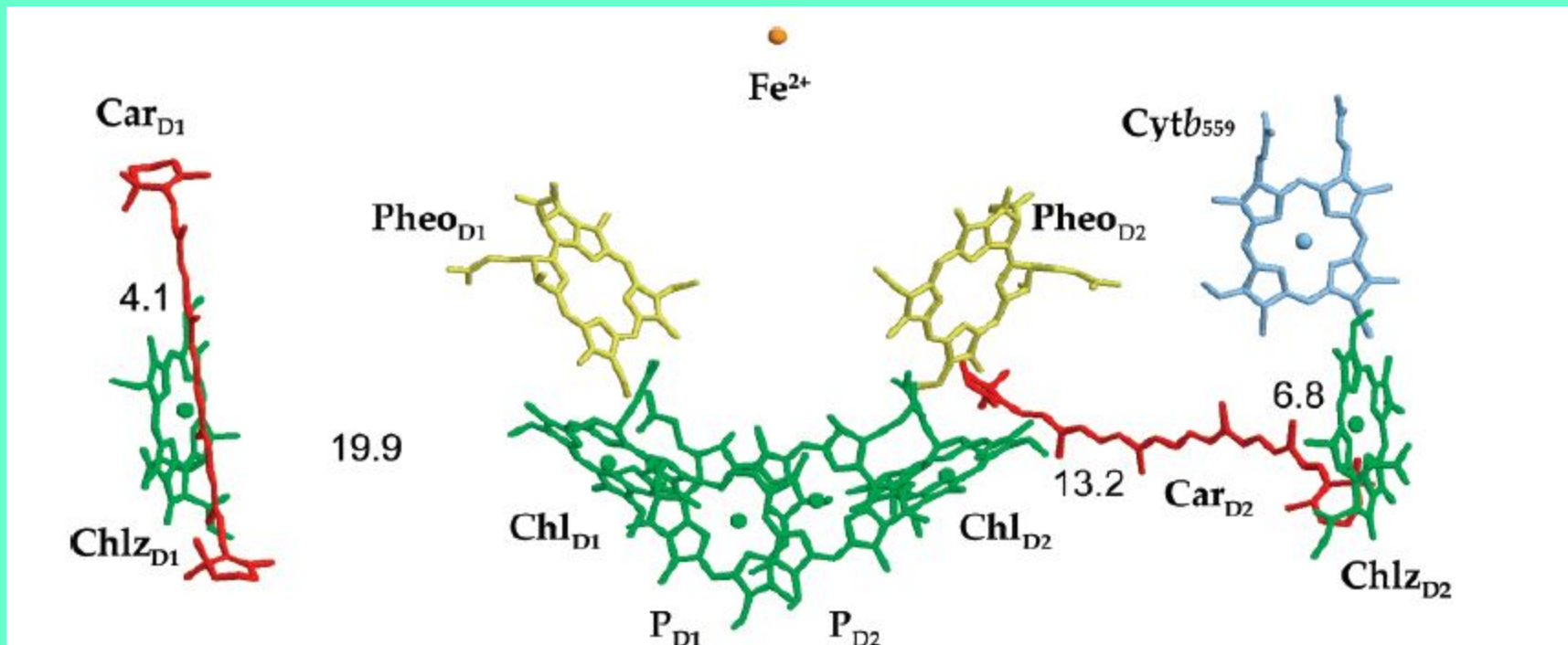


Фосфорилируются
белки CP29, CP26

ФОТОИНГИБИРОВАНИЕ.

ЗАЩИТА ОТ ФОТОИНГИБИРОВАНИЯ. Цитохром *b*-559.

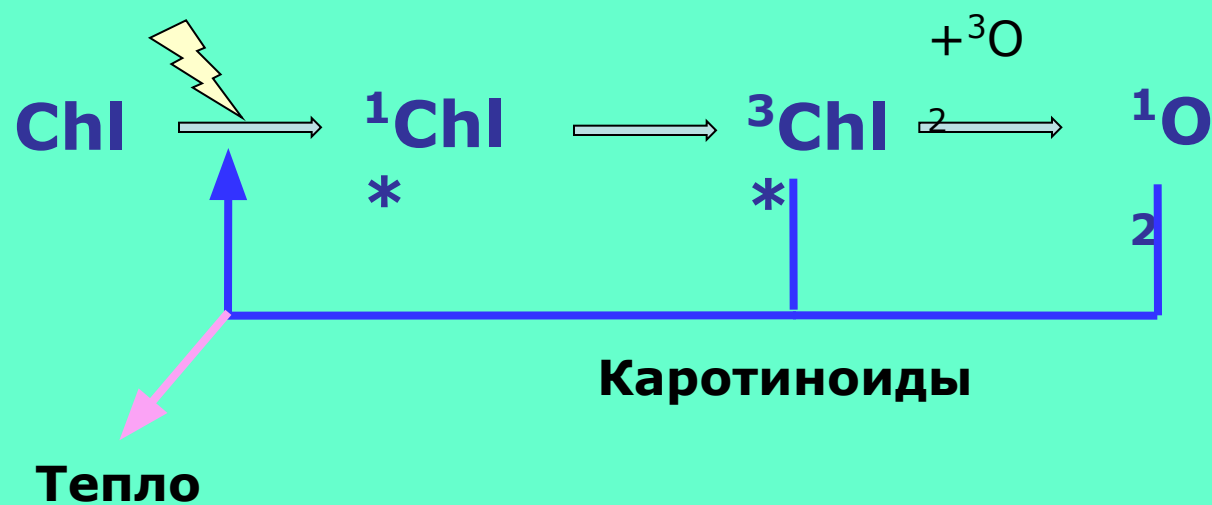




Arrelano et al., 2007

ФОТОИНГИБИРОВАНИЕ.

ЗАЩИТА ОТ ФОТОИНГИБИРОВАНИЯ. Каротиноиды.



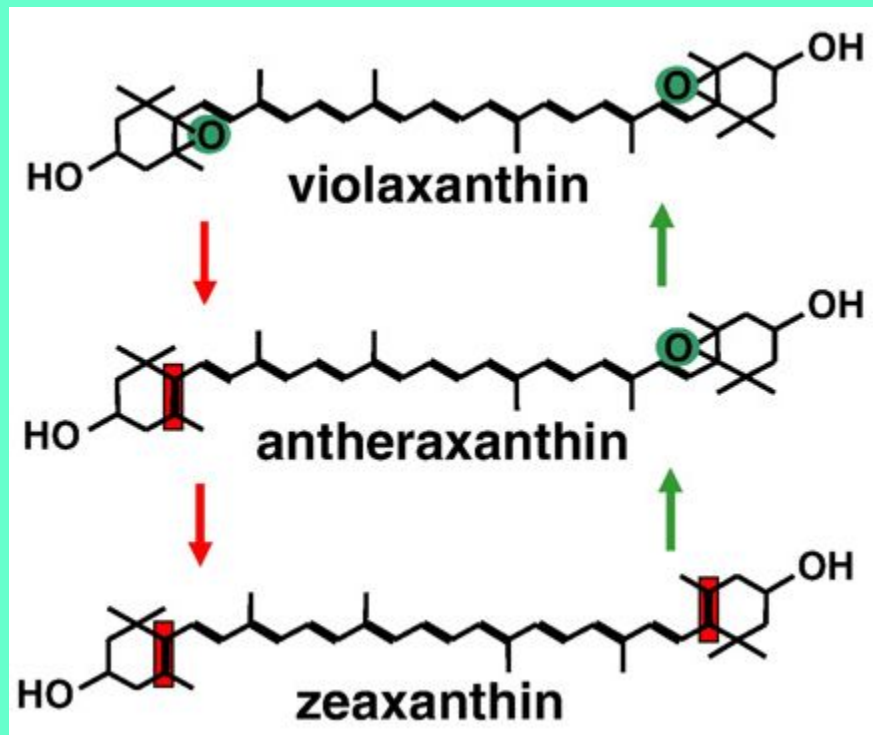
ФОТОИНГИБИРОВАНИЕ.

ЗАЩИТА ОТ ФОТОИНГИБИРОВАНИЯ. *Ксантофильный цикл.*

В растениях и водорослях существуют механизм защиты от фотоингибирования, вызываемого сильным светом – ксантофильные циклы.

Ксантофильный цикл обеспечивает обратимое переключение LHCII между светособирающей функцией (низкая интенсивность света) и рассеивающей функцией.

Известно 3 ксантофильных цикла. Наиболее распространенным является виолоксантиновый цикл – переход между виолоксантином и зеаксантином.



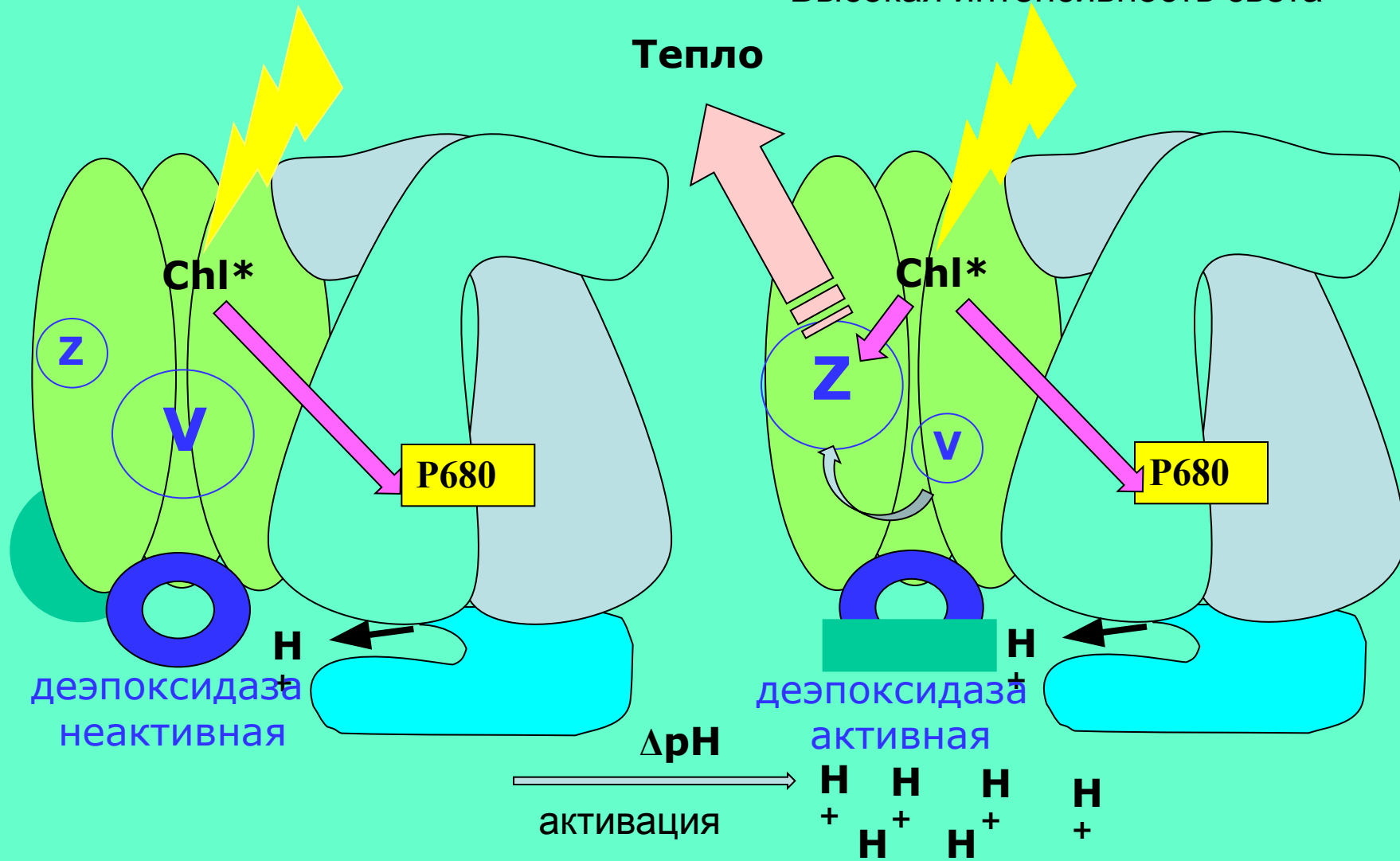
V - виолаксантин

Z - зеаксантин

Низкая интенсивность света

Высокая интенсивность света

Тепло



Сборка суперкомплекса ядро ФС2- ССК2 in vivo

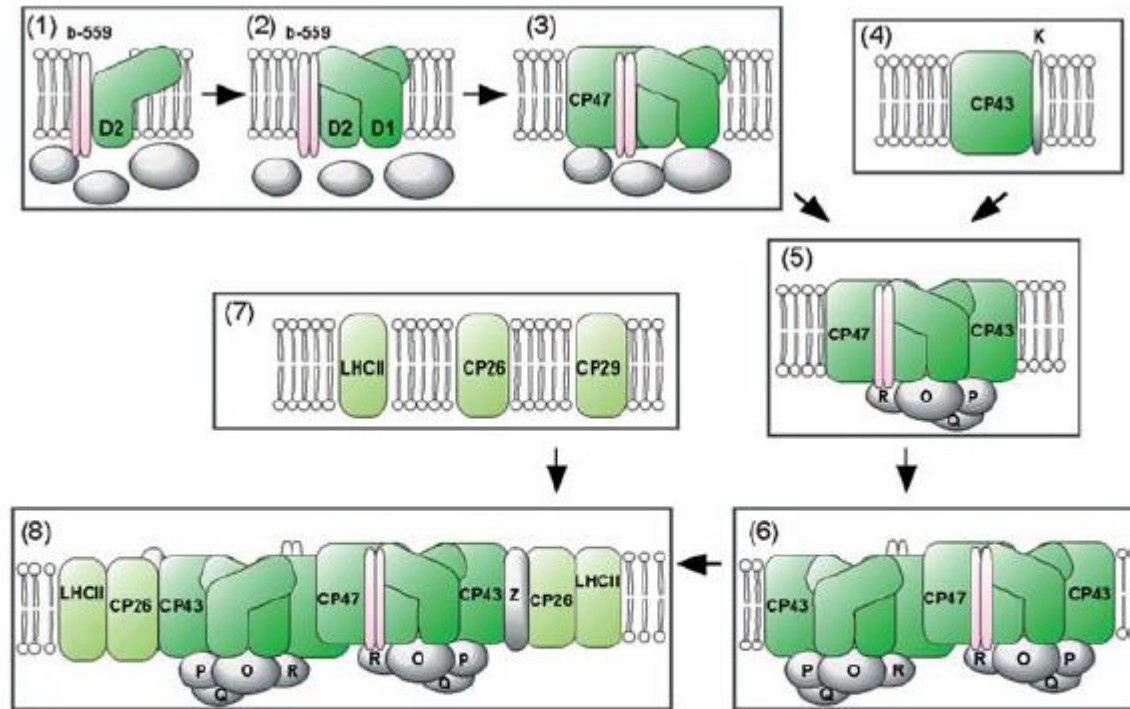
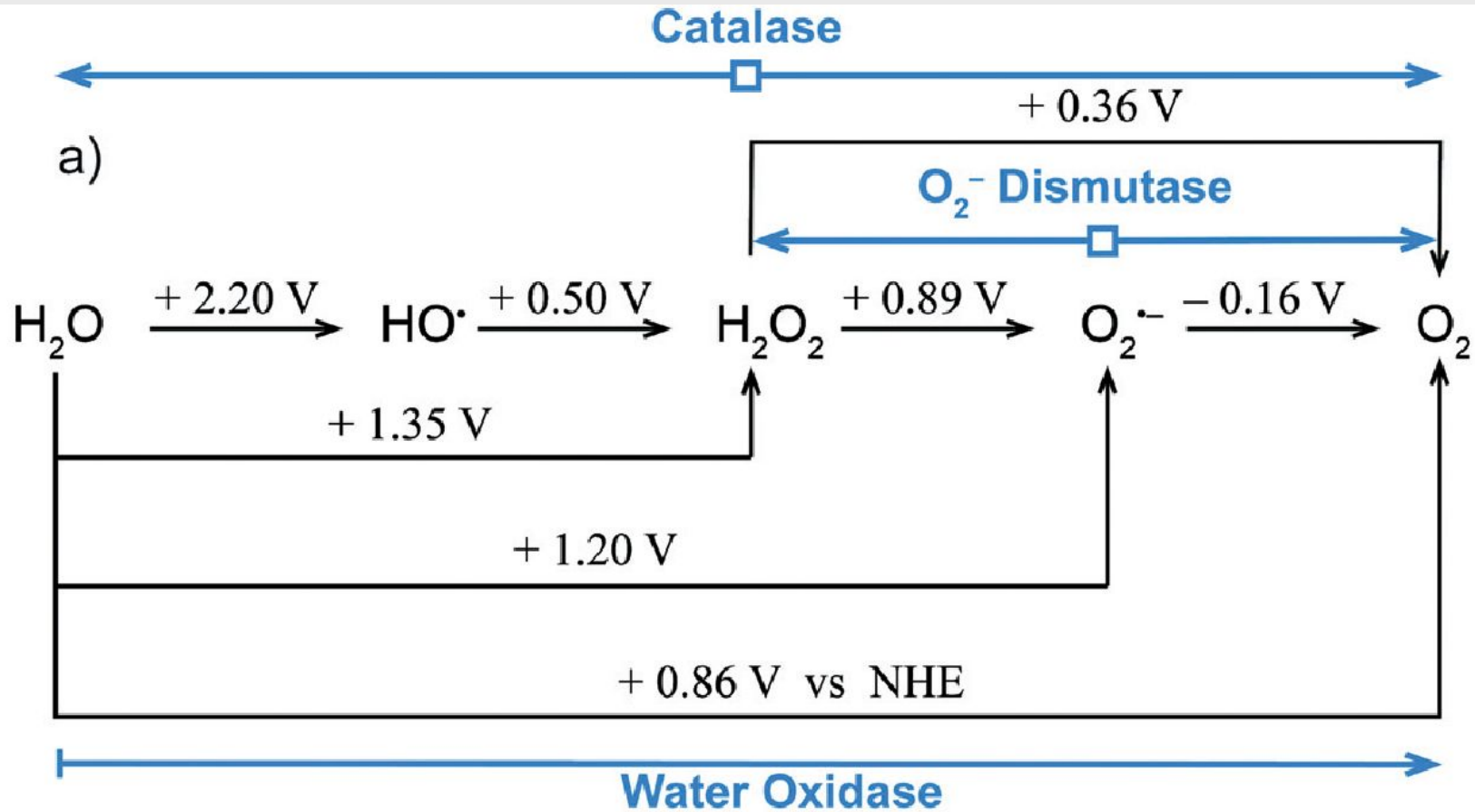


Figure 3. Model for assembly of the PSII-LHCII supercomplex. Proposed assembly steps are as follows: (1) formation of a pre-complex consisting of Cyt *b*₅₅₉ and D2, (2) integration of D1 into the precomplex to form RC, (3) integration of CP47 into the RC to form RC-CP47 sub-complex, (4) assembly of CP43-PsbK sub-complex, (5) integration of CP43-PsbK into RC-CP47 to form PSII core complex and binding extrinsic polypeptides on the luminal side of PSII core complex, (6) dimerization of PSII core complex, (7) synthesis of major and minor antenna complexes independently of the assembly of PSII core complex, (8) association of PSII core complex dimer and outer antenna to form PSII-LHCII supercomplex.

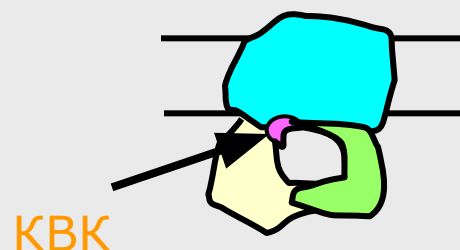
Кислород-выделяющий комплекс

РЕАКЦИИ ОКИСЛЕНИЯ ВОДЫ И РЕДОКС-ПОТЕНЦИАЛЫ (В)



Компоненты, образующие КВК

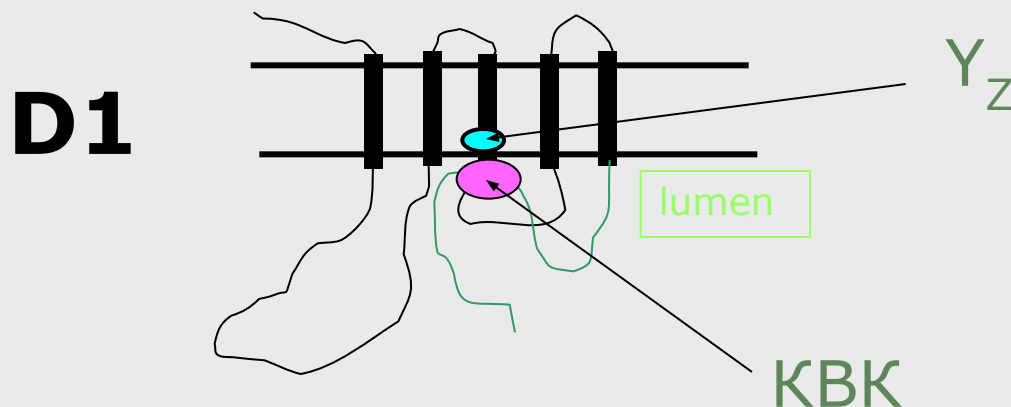
- ◆ 4 катиона марганца
- ◆ 1 катион кальция
- ◆ 2 аниона хлора
- ◆ 5 атомов кислорода
- ◆ Тирозин YZ (?)
- ◆ Гистидин (?)



- ◆ В стабилизации каталитического центра принимают участие периферические белки **33, 24 и 16** кДа, расположенные с внутренней стороны тилакоидной мембраны (lumen) и закрывающие каталитический центр.
- ◆ **33** кДа белок участвует в стабилизации марганцевого кластера (иногда используется название "марганец-стабилизирующий белок").
- ◆ Белки **24 и 16** кДа участвуют в стабилизации кальция и каким-то образом связаны с обеспечением функционирования хлора.

Локализация катионов марганца и кальция в ФС2

- ◆ КВК расположен с внутренней стороны (lumen) тилакоидной мембраны.
- ◆ В связывании марганца и кальция принимают участие аминокислоты С-концевого участка полипептида D1 и одна аминокислота полипептида CP43.

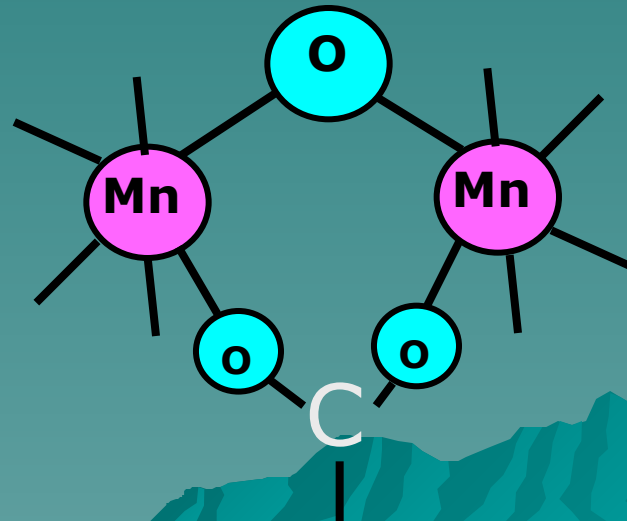
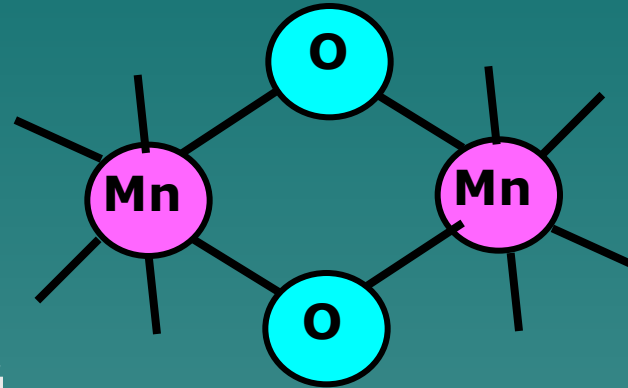


СТРУКТУРА Mn/Ca КЛАСТЕРА

- ◆ По аналогии с **Mn-связывающими белками** в координации марганца могут принимать участие **азот** (гистидин) и **кислород** (карбоксильные группы глутаминовой или аспарагиновой аминокислот).
- ◆ Максимальное количество аминокислот, участвующих в связывании марганца = $6 \times 4 = 24$,
однако, это число значительно меньше, поскольку катионы марганца и кальция образуют кластер, в котором катионы металлов соединены между собой.

СТРУКТУРА Mn/Ca КЛАСТЕРА

- ◆ Катионы металлов могут быть соединены между собой мостиками:
- ◆ атомами кислорода
- ◆ карбоксильной группой



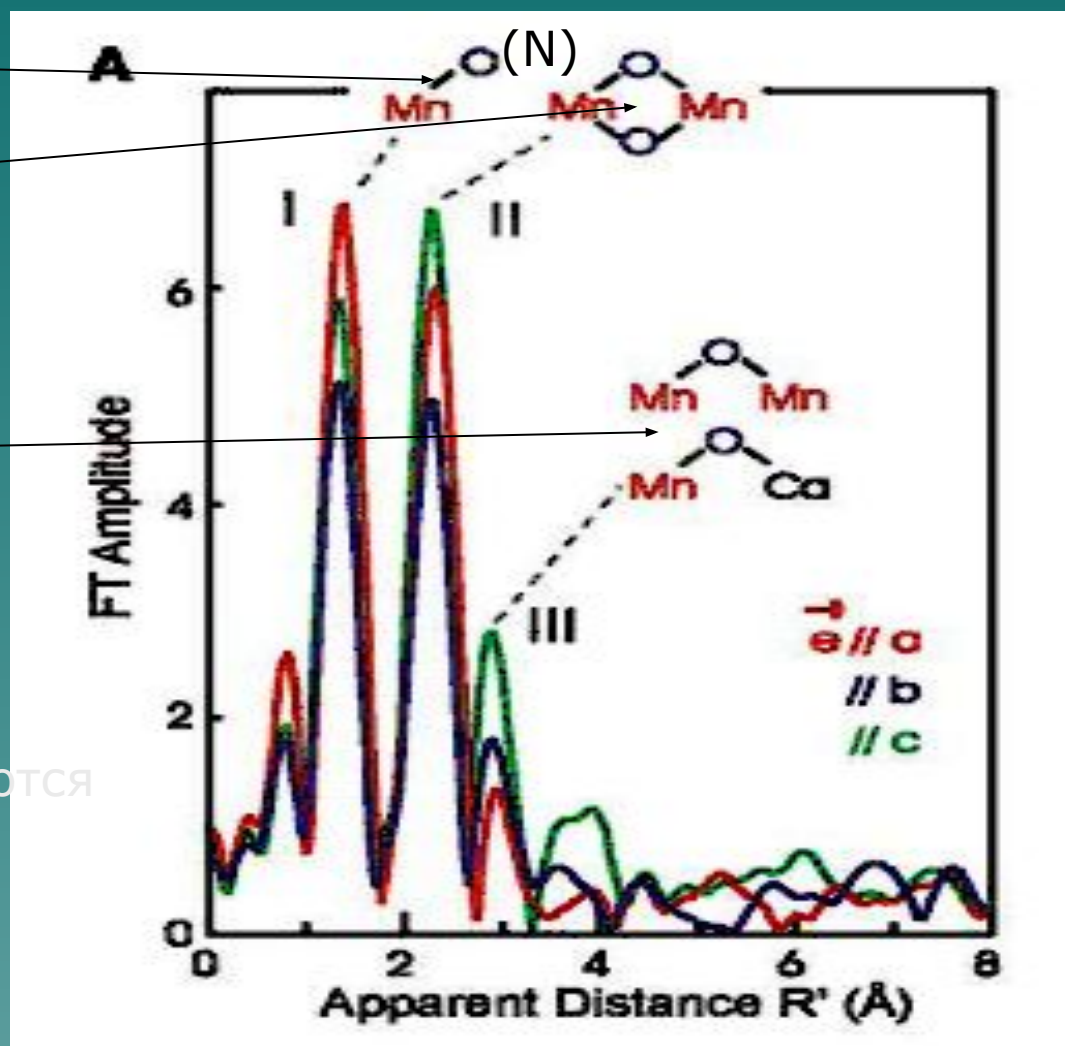
Использование EXAFS для определения расстояний между катионами марганца и ближайшими лигандами в его координационной сфере.

1,8 – 2,0Å

Mn...Mn
расстояние 2,7Å
(два или три)

3,3 – 3,5Å
(один или два)

Измерено для
состояния S1.
При переходе из
S2 в S3 наблюдаются
изменения в
расстояниях.



Рентгеноструктурный анализ ФС2

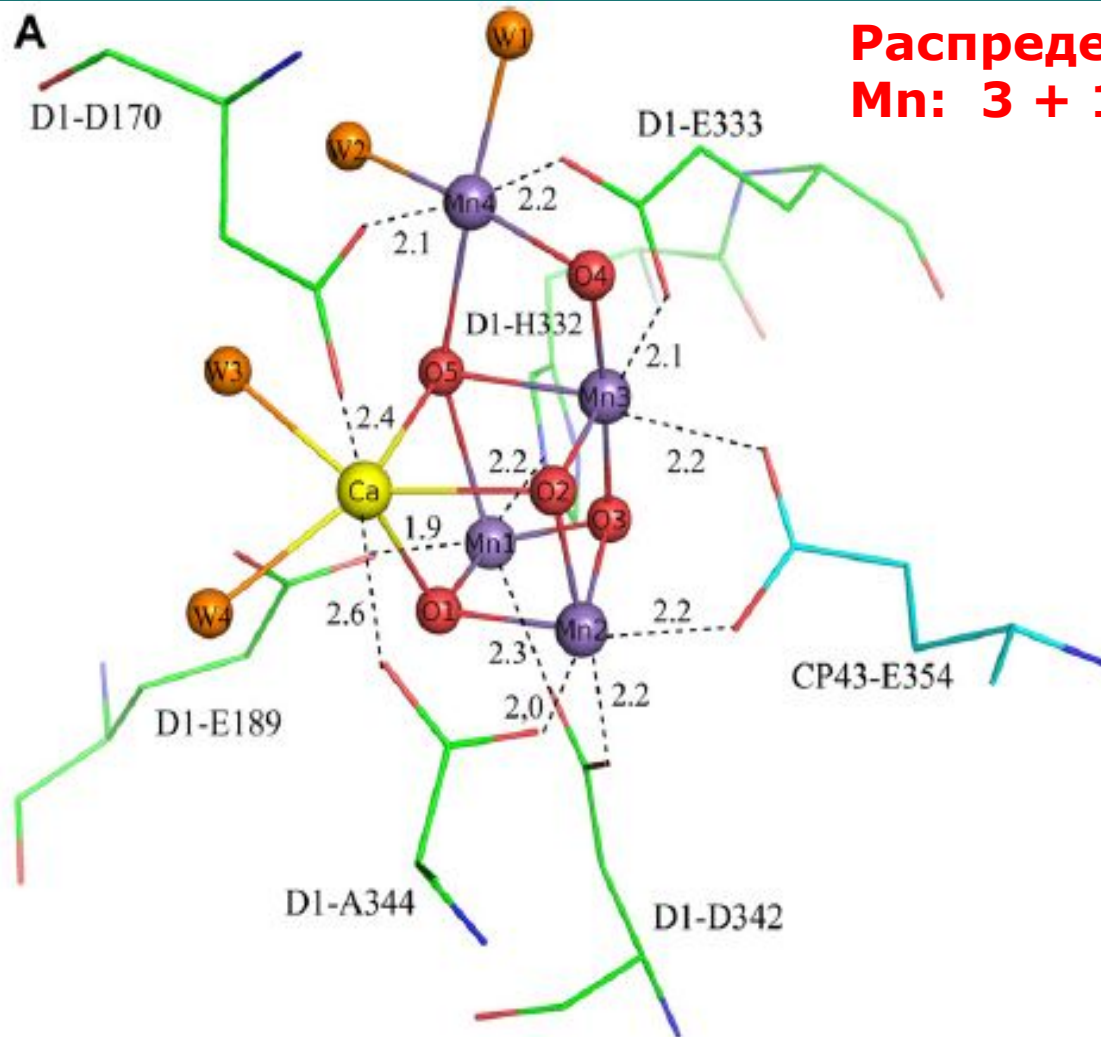
- ♦ Впервые структура фотосинтетического реакционного центра 2го типа (пурпурные бактерии *Rhodopseudomonas viridis*) была определена с использованием рентгеноструктурного анализа в 1984 г. (Deisenhofer et al., 1984).
- ♦ Рентгеноструктурный анализ ФС2.
- ♦ Umena et al., 2011 *Thermosynechococcus vulcanus* 1.9 Å
- ♦ Изучение структуры ФС2.
- ♦ До решения проблемы кристаллизации ФС2 для изучения ее структуры использовался метод EXAFS (Extended X-ray Absorption Fine Structure, рассеяние X-лучей на катионах марганца), позволяющий определить расстояние между катионом металла и его лигандами и, таким образом, прогнозировать структуру кластера.

Структура Mn/Ca кластера

Umena et al. 2011

Разрешение 1.9 Å

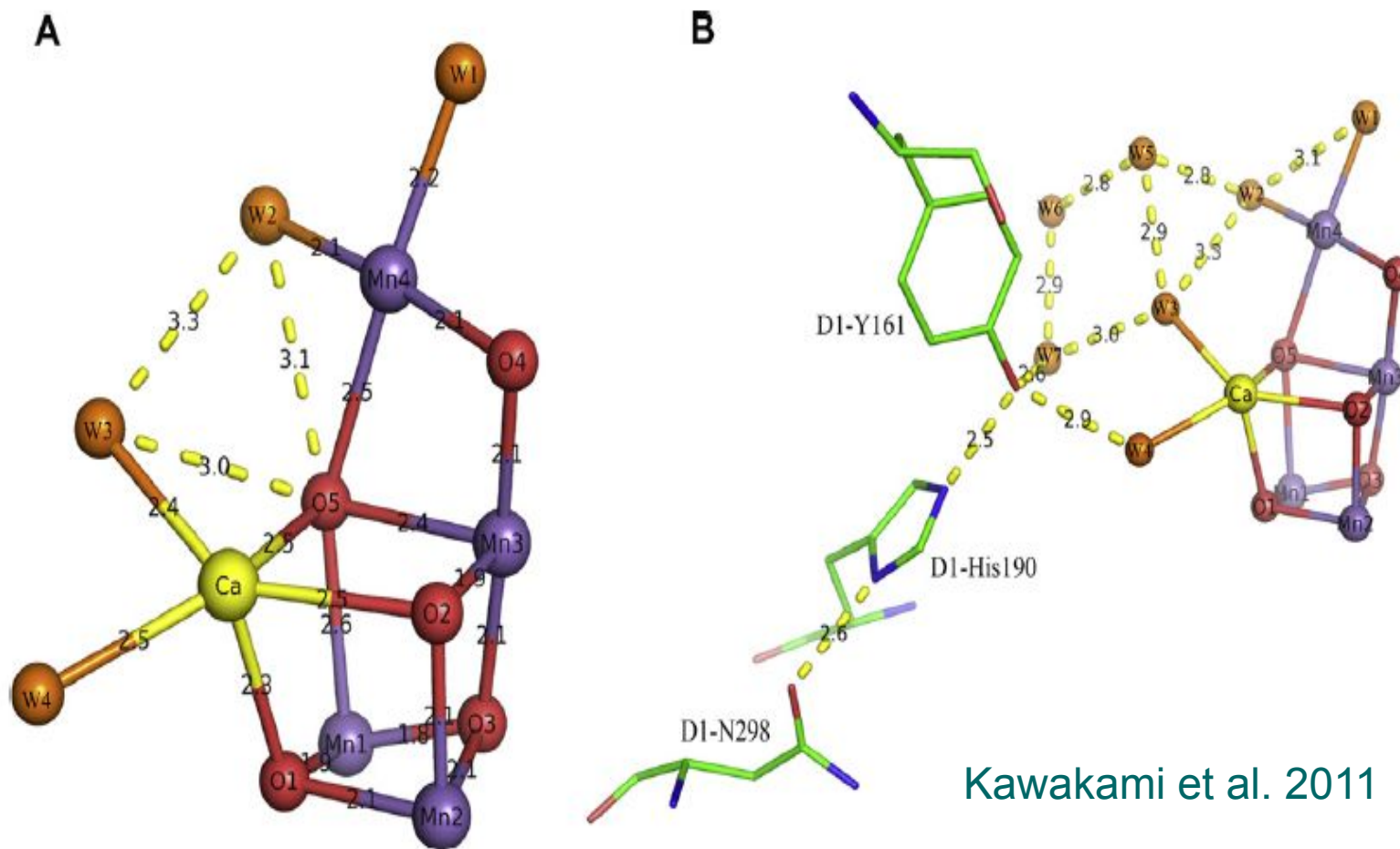
**Распределение катионов
Mn: 3 + 1**



Структура Mn/Ca кластера

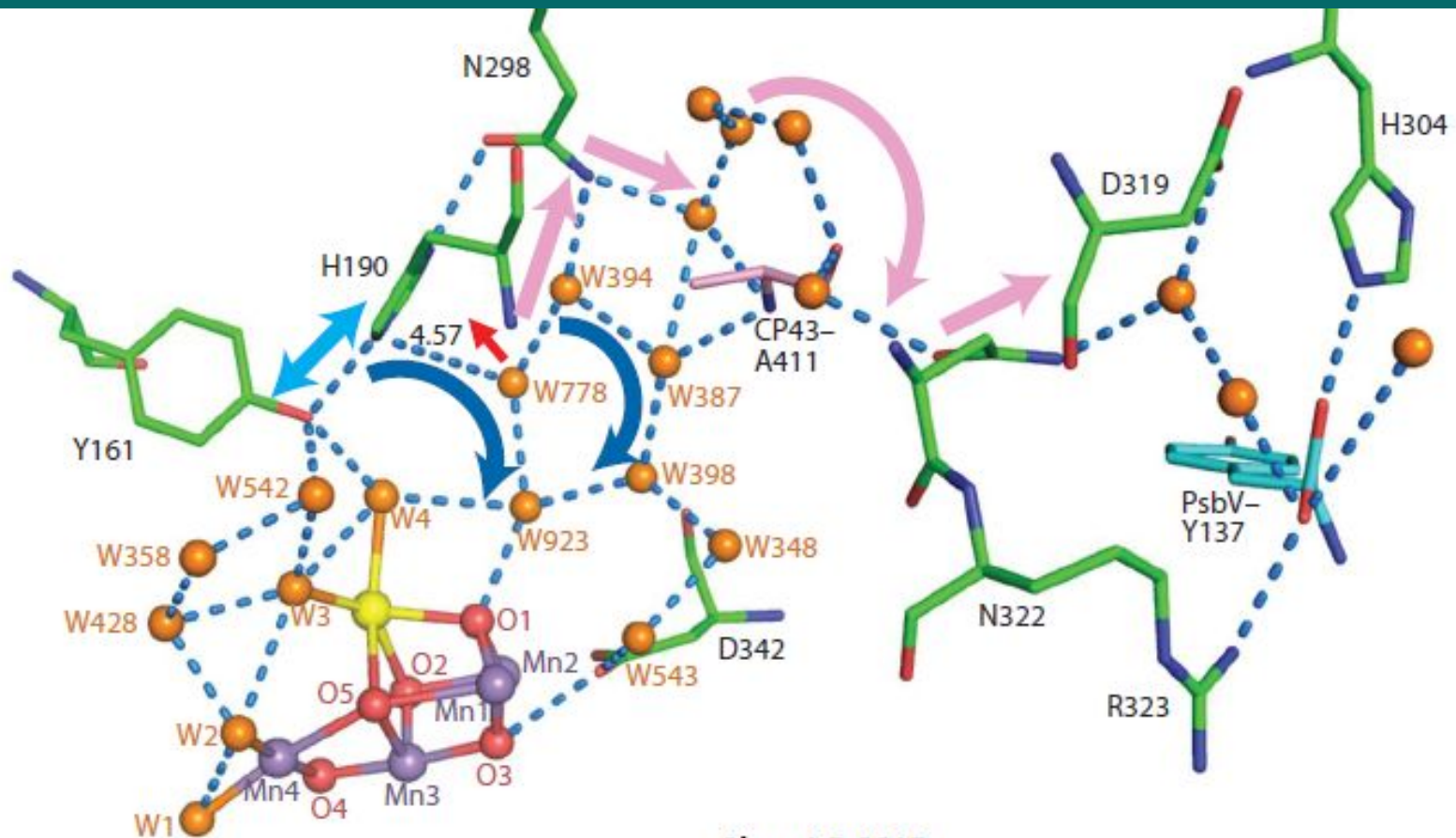
Kawakami et al., 2011

Разрешение 1,9 Å



Kawakami et al. 2011

Fig. 2. Structure of the Mn₄CaO₅-cluster determined at 1.9 Å resolution. (A) Structure of the metal cluster with oxo-bridges and water ligands. The bond distances were shown in Å. Hydrogen bonds were depicted as dashed lines. (B) Hydrogen-bond network linking the Mn₄CaO₅-cluster and Y₂, and further from Y₂ to the opposite side.



Shen J-R 2015

Figure 5

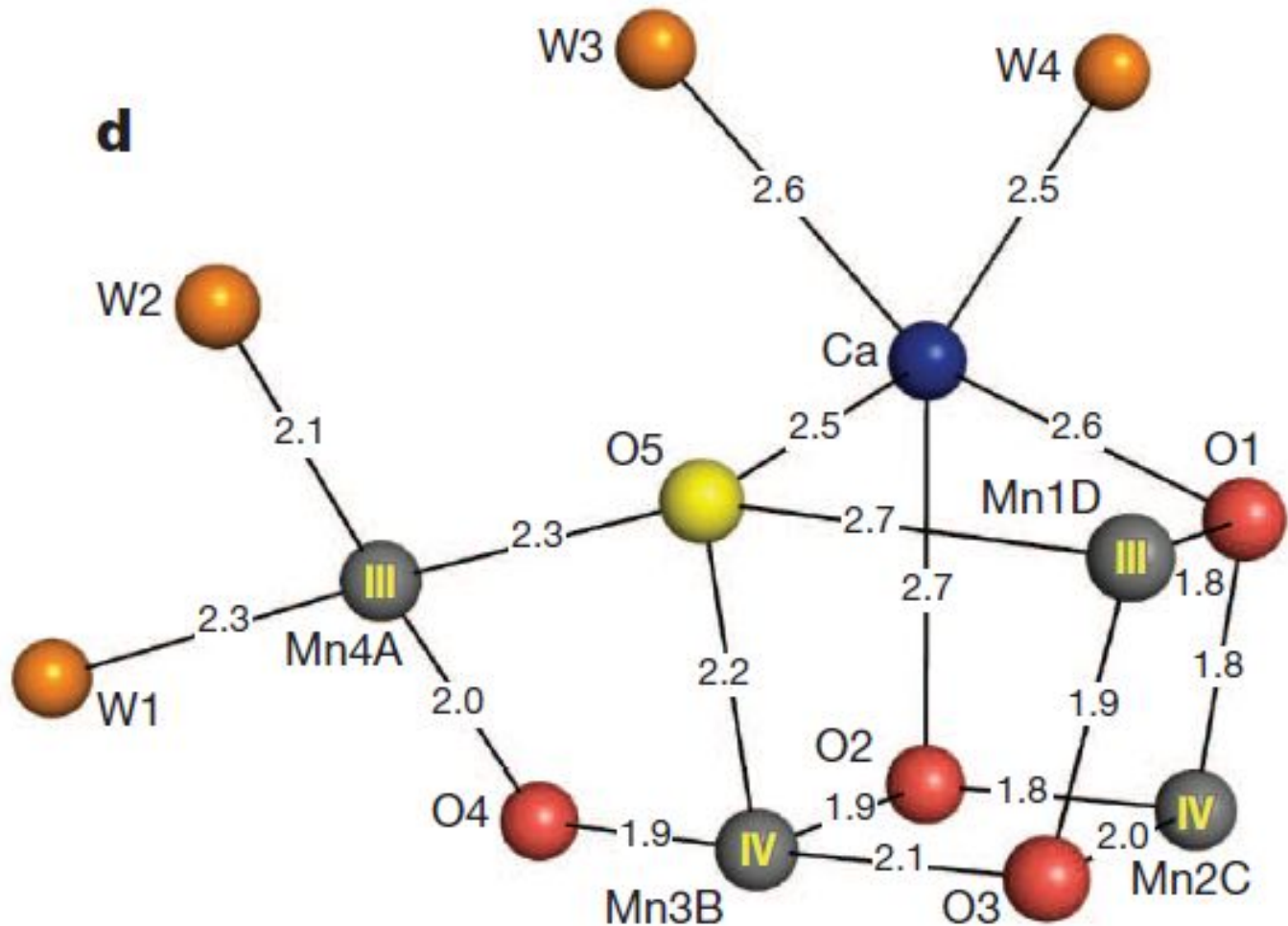
Hydrogen-bond network connecting the Mn_4CaO_5 cluster and Y_Z . The numbering of the water molecules is based on PDB ID 3ARC, with the exceptions of W1–W4. Residues of D1 are in green, a residue of PsbV is in cyan, and a residue of CP43 is in pink. The cyan arrow indicates a possible proton transfer from His190 back to Y_Z , the blue arrows indicate proton paths mediated by several water molecules back to the Mn_4CaO_5 cluster, and the pink arrows indicate proton paths out to the luminal solution.

Структура Mn/Ca кластера

- ♦ Структура марганцевого кластера, определенная японской группой, по-видимому, хорошо отражает реальную картину расположения катионов металла и связывающих мостиков в каталитическом центре КВК.
- ♦ Однако, детали структуры могут быть некорректными.
- ♦ Данная проблема связана с возможностью восстановления катионов марганца под действием X лучей в процессе облучения кристалла ФС2.
- ♦ Например, длины связей между катионом марганца и O/N лигандами отличаются на 0,1Å (больше) от данных, полученных EXAFS методом (мощность облучения значительно меньше), а также расстояния между центральным атомом O5 и катионами марганца не наблюдаются для связей между Mn(III,IV) и кислородом во всех модельных системах.

Структура Mn/Ca кластера

Suga et al 2014-2015 Native structure of photosystem II at 1.95Å^o resolution viewed by femtosecond X-ray pulses



- ♦ Оценка параметров связь-валентность позволяет утверждать, что редокс состояние марганцевого кластера соответствует состоянию II, II,III,III, а не III, III, IV, IV (Grundmeier & Dau 2012).
- ♦ О восстановлении марганцевого кластера при облучении свидетельствует также удлинение связей между катионами марганца.

Лиганды, связывающие Mn4/Ca кластер

Structure	Mn1	Mn2	Mn3	Mn4	Ca
London (Ferreira et al.) 2004 (3,5A)	D342	H332, E189	E354 ^a	D170, E333	-
Berlin (Loll et al.) 2005 (3,0A)	D342, E189 H332	A344 ^b , D342 E354 ^a	E354 ^a E333	D170, E333	A344 ^b , Y _Z , E189
Japan (Kawakami et al.) 2011 (1,9 ^a)	D342, E189 H332	A344 ^b D342 E354 ^a	E354 ^a , E333	D170, E333	A344 ^b D170

Функция марганца в окислении ВОДЫ

- Марганцевый кластер накапливает окислительный потенциал (**аккумулятор электрических зарядов**) по мере поглощения квантов света и окисляет две молекулы воды, синтезируя молекулярную связь между атомами кислорода



Скорость выделения кислорода как функция номера вспышки

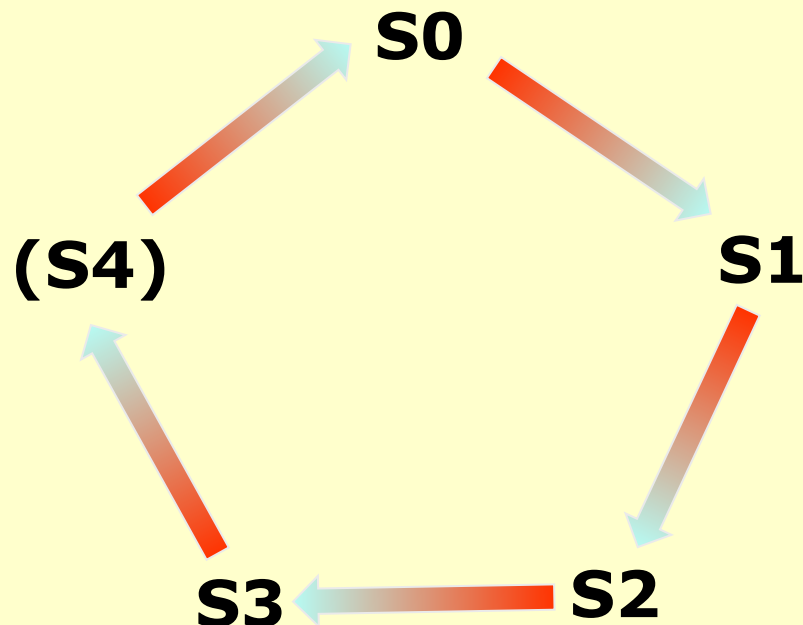
◆ Joliot, Kok, 1975



S-цикл КВК

4-х тактная зависимость выделения кислорода от номера вспышки была объяснена следующим образом.

Кислород-выделяющий комплекс (КВК) может находиться в 4 состояниях (State): S0, S1, S2, S3 (иногда еще используют S4 – промежуточное состояние при переходе КВК из состояния S3 в S0). По мере поглощения фотонов за счет окисления КВК последовательно переходит из состояния S0 в более окисленное состояние S3, а затем, в результате восстановления КВК электронами воды (4 электрона), возвращается в состояние S0, т.е. осуществляется циклическое функционирование КВК.



СВОЙСТВА S-СОСТОЯНИЙ

- ◆ **S-состояние фактически означает уровень окисленности КВК.**
- ◆ **Стабильным состоянием (в котором КВК находится в темноте) является S1 (около 75% центров), поэтому максимум выделения кислорода в начале наблюдается после 3 вспышки. Около 25% центров находится в состоянии S0.**

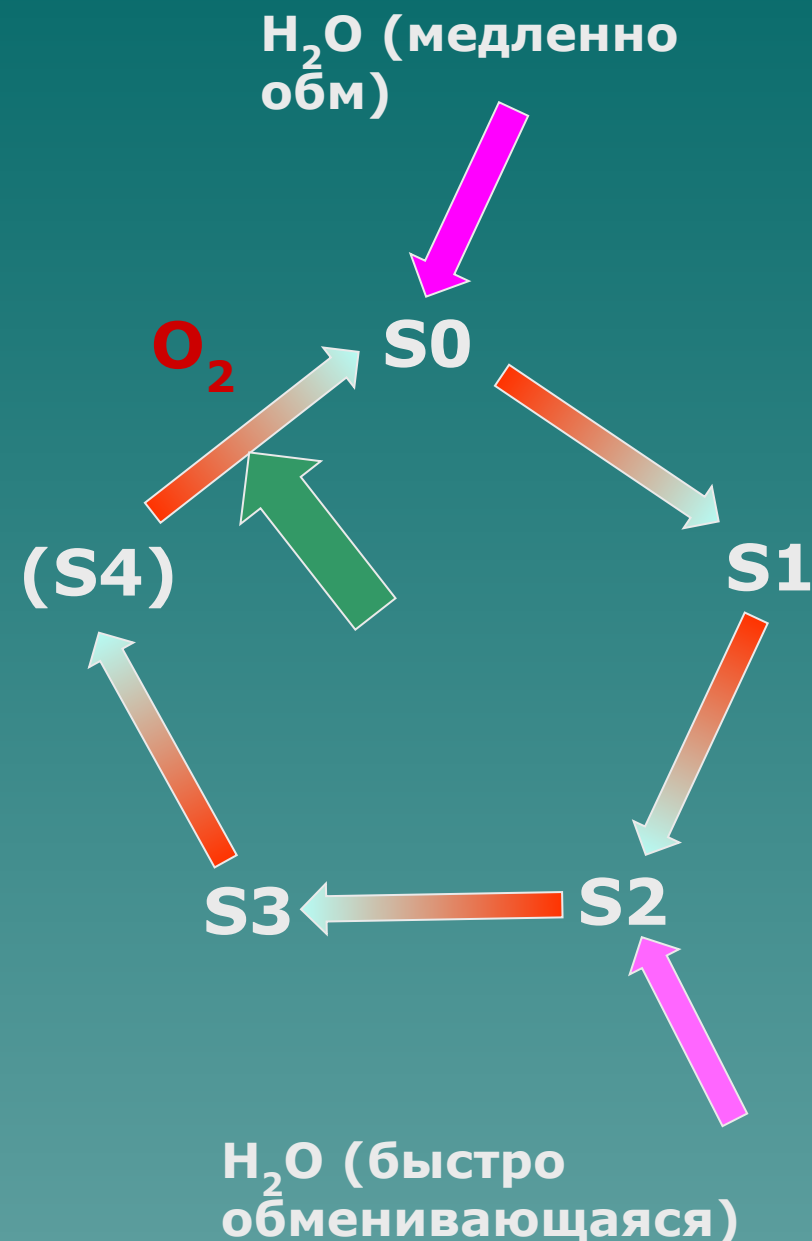
СВОЙСТВА S-СОСТОЯНИЙ

На свету количество KBK в каждом из S-состояний составляет 25%.

В отличие от S0 и S1 состояния S2 и S3 в темноте не стабильны. KBK восстанавливается, переходя соответственно в состояние S1 и S2 (затем в S1). Время жизни в темноте состояний S2 и S3 около 30 - 100 сек. В присутствии акцепторов электронов время жизни увеличивается до нескольких минут.

Стабильность состояний S0 и S1 и достаточно продолжительное время жизни состояний S2 и S3 позволяет их исследовать, тогда как состояние S4 нестабильно, переход в S0 происходит спонтанно и не зависит от света, что затрудняет исследование состояния S4.

Связывание воды



Механизм связывания воды является очень важным для понимания механизма окисления воды.

Связывание воды изучалось с использованием изотопа H_2O^{18} , и изотопа H_2O^{16} .

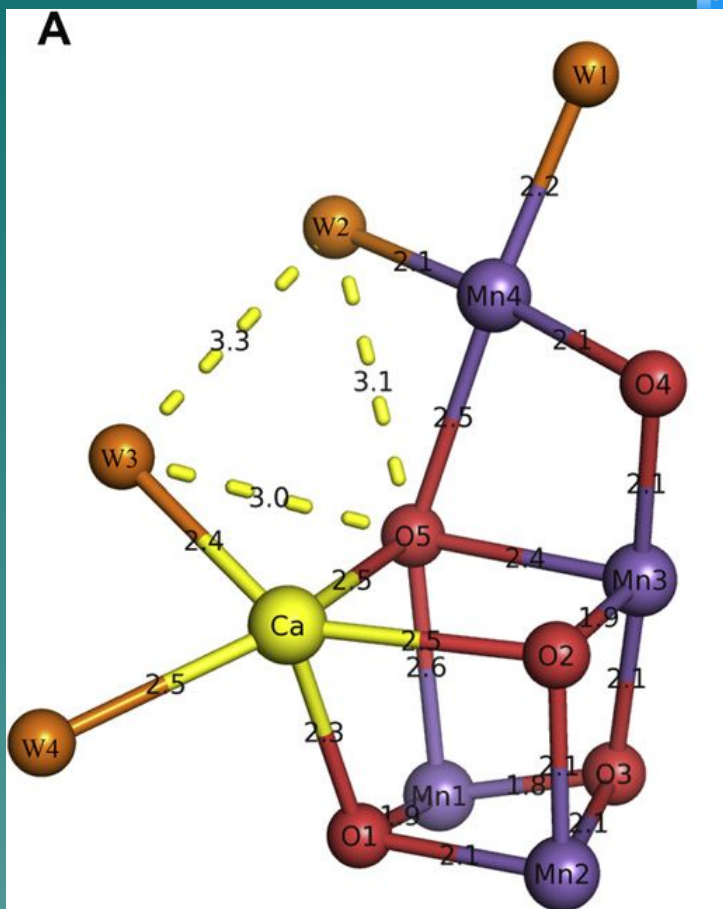
Имеется два участка связывания воды, отличающиеся по скорости обмена.

Одна молекула воды связывается в S0 состоянии, а другая в состоянии S3 или S2. Скорости обмена:

низкая скорость обмена
($< 2,1 \text{ c}^{-1}$) и

большая скорость обмена
(10^2 c^{-1}).

Какая из молекул воды в КВК является субстратной водой (быстро и медленно обменивающаяся вода)?



в S1 состоянии марганцевого кластера по данным рентгеноструктурного анализа молекулы 2 воды связаны с Ca^{2+} (W3 и W4) и 2 молекулы воды – с Mn^{4+} (W1 и W2) (Umena et al. 2011), однако, неясно, субстратная это вода или нет;

- в синтезе молекулярного кислорода могут также участвовать атомы кислорода кислородных мостиков O1 – O5.

Более вероятно, что быстро обменивающаяся молекула воды - это молекула воды W_2 , связанная с катионом марганца Mn_4 (Cox & Messinger 2013).

Медленный участок связывания воды, по-видимому, представлен мостиком O_5 связывающим катионы марганца (Mn_4) и Ca).

Связывание воды

Форма связанной воды – OH^- , H_2O или $\mu\text{-O}$ мостик?

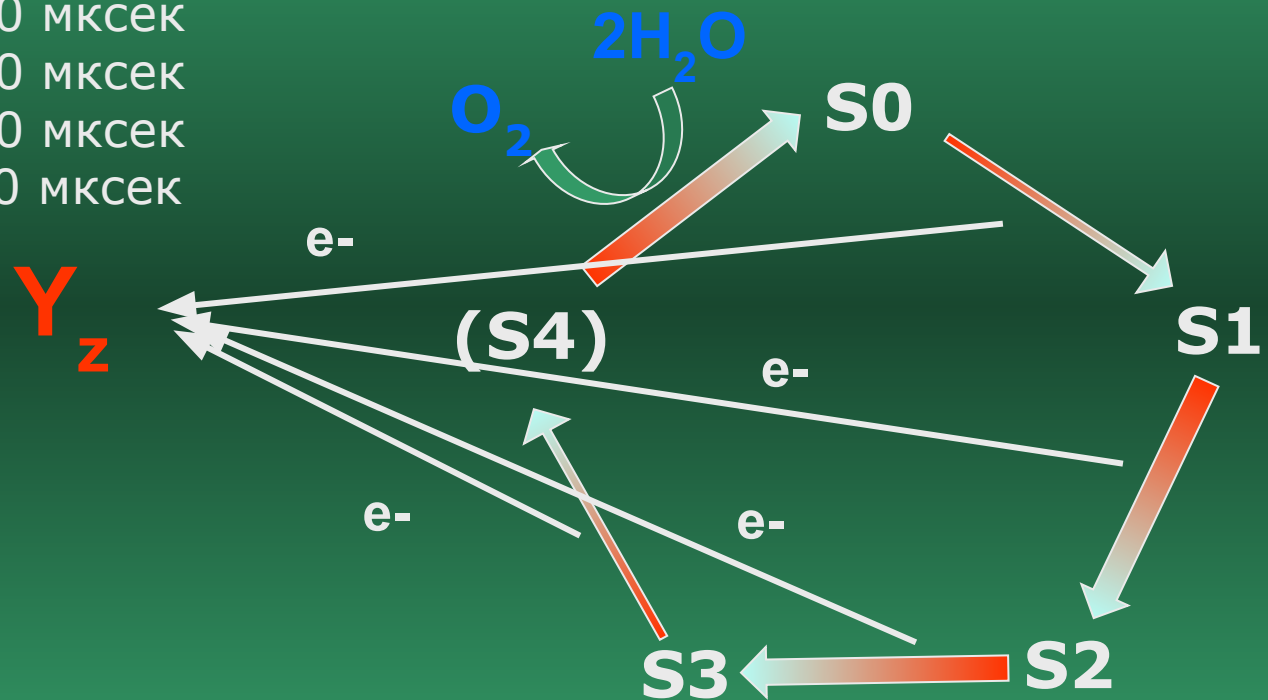
- молекула воды, связанная с кальцием, по-видимому, находится в нейтральной форме (не OH^-), поскольку pK_a воды, связанной с Ca равно 12,8;
- молекула воды, связанная с Mn, по-видимому, находится в ионизированной форме, поскольку pK_a воды, связанной с Mn равно 10,5 (для MnII), 0 (для MnIII) и даже остающийся протон теряется при дальнейшем окислении Mn (MnIV), который координирует O^{2-} .

При увеличении формальной степени окисления Mn электрон отбирается у O^{2-} , т.е. образуется охл радикал $\text{O}^{\cdot-}$

S-цикл каталитического центра ОКИСЛЕНИЯ ВОДЫ

Перенос электрона

S0 – S1	30 – 70 мксек
S1 – S2	100 мксек
S2 – S3	200 мксек
S3 – S4	200 мксек
S4 – S0	1100 мксек

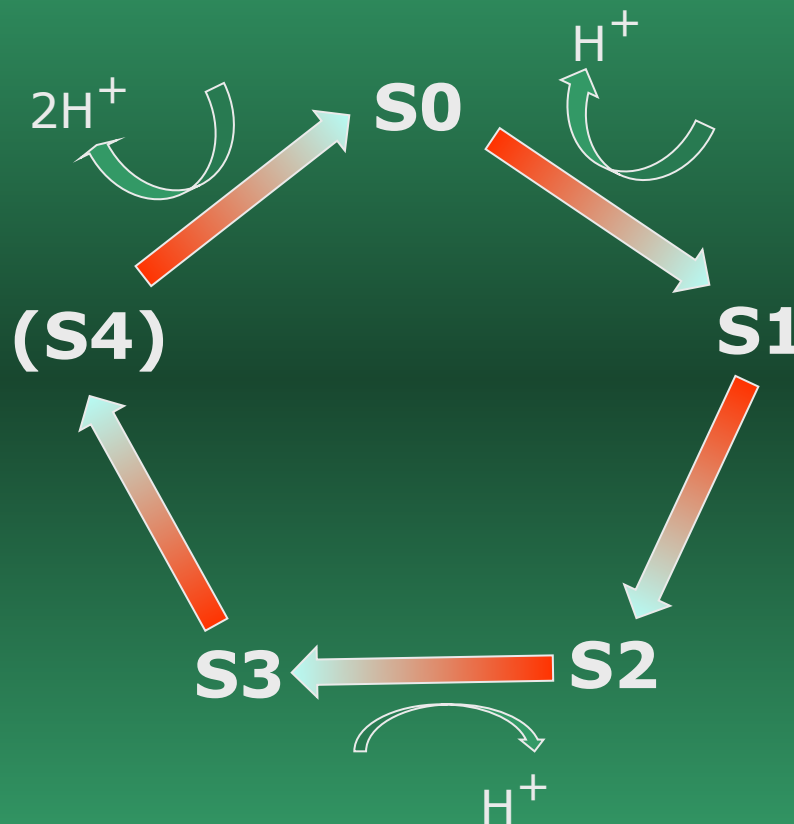


Т.е., одна ФС2 выделяет 1 молекулу кислорода за время около 2 мсек

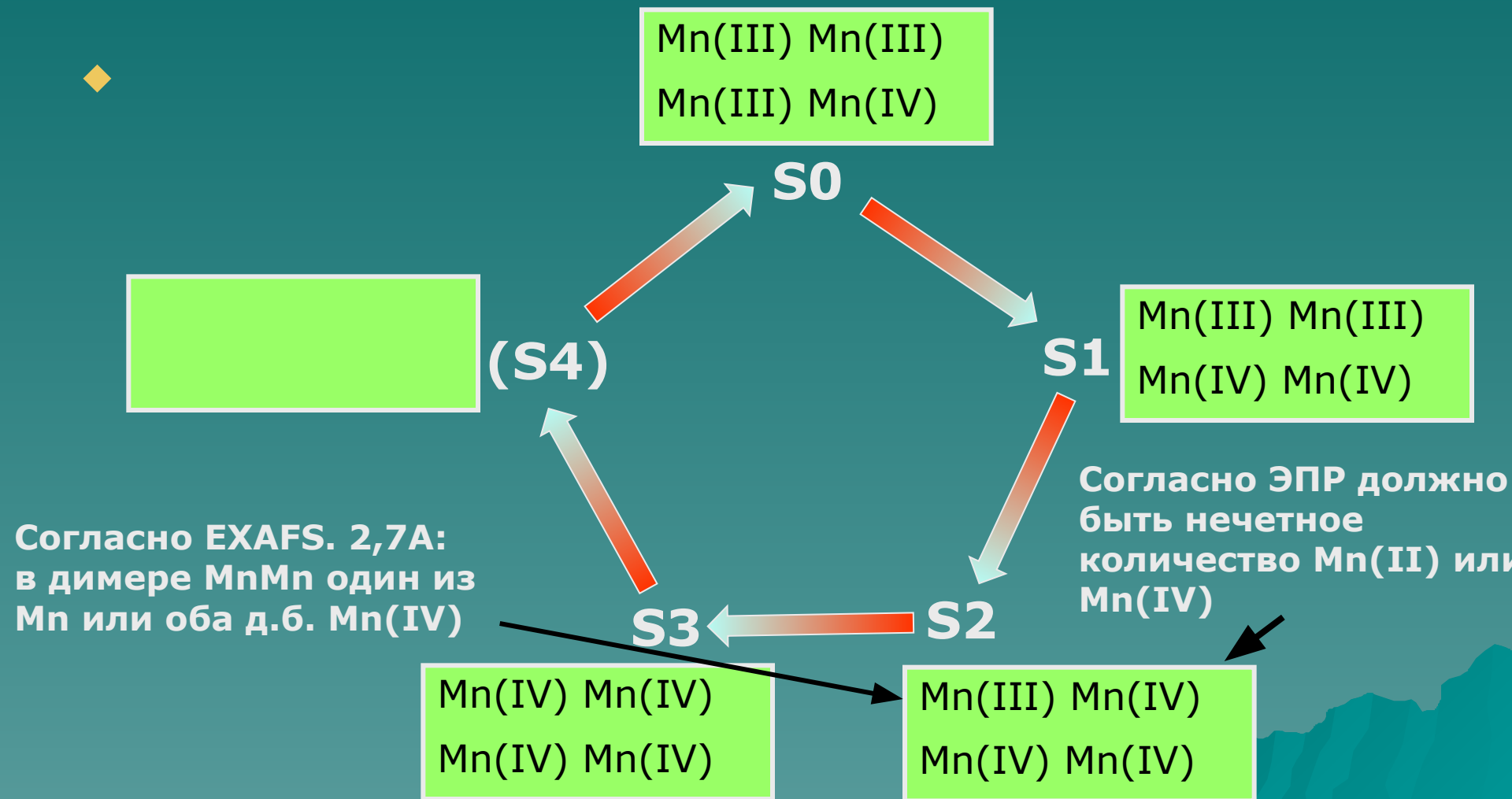
Выделение протонов

Откуда протоны?

Схема выделения протонов в соответствии с S-переходом меняется в зависимости от типа образца, pH и т. д.. Более того, величины часто дробные. Эти данные показывают, что протоны, на самом деле, появляются в результате депротонирования аминокислот.



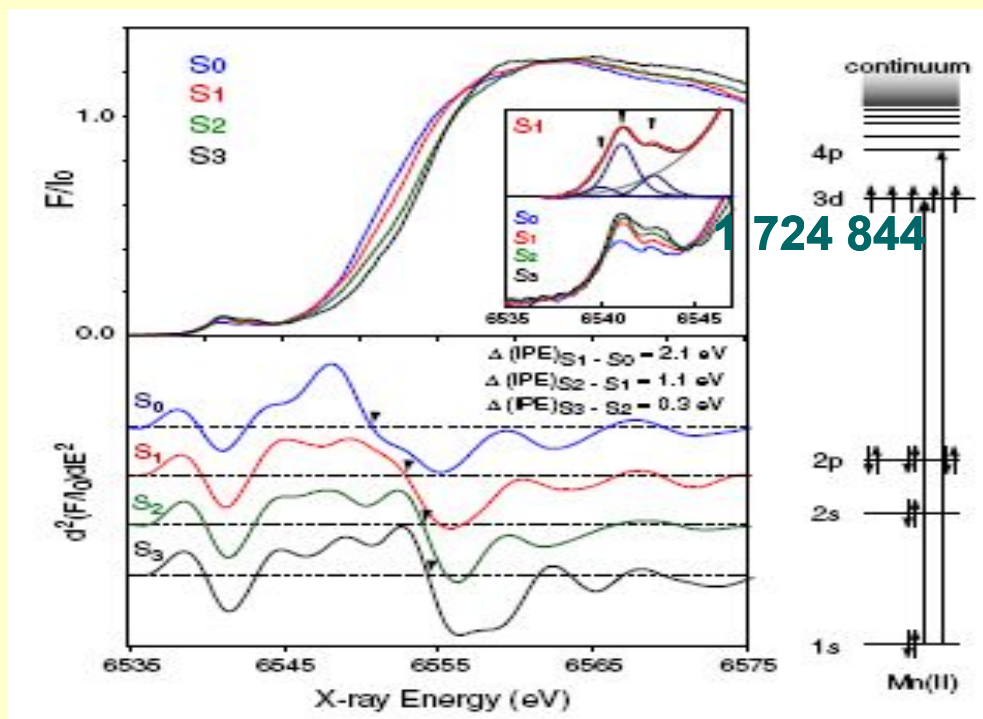
Окислительно-восстановительное состояние марганцевого кластера



Использование XANES для изучения редокс изменений марганцевого кластера в процессе S цикла



◆ XANES – X-ray Absorption Near-Edge Spectroscopy

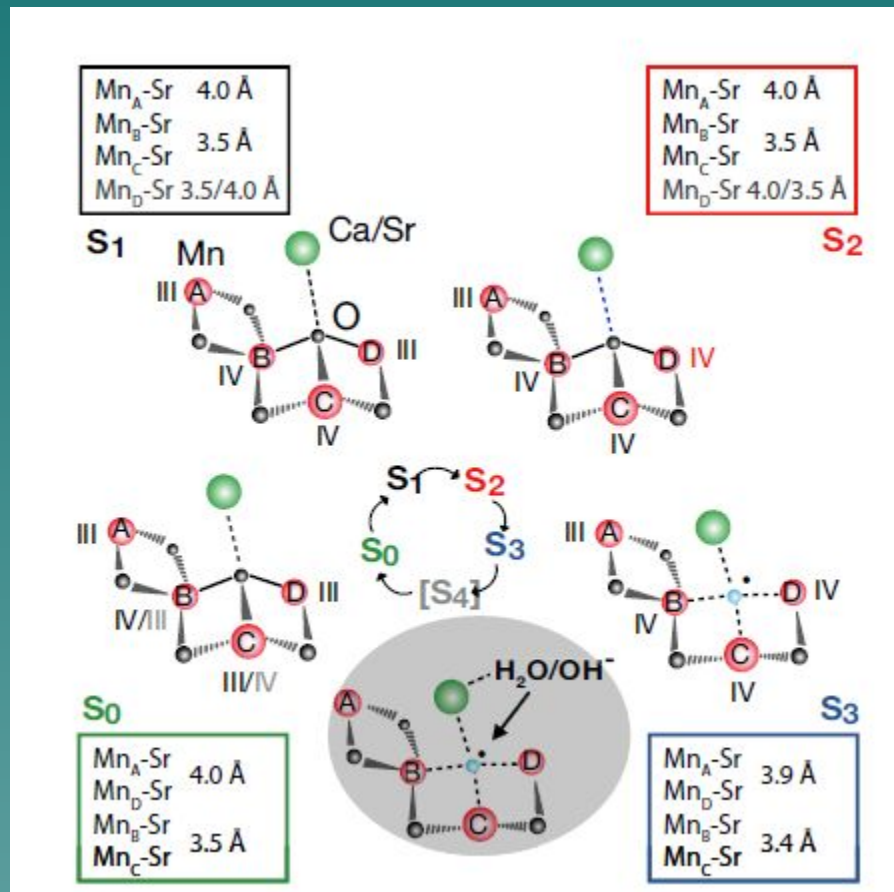


Yano&Yachandra, 2007

Природа компонента, окисляющегося при переходе S2 – S3.

Методом EXAFS зарегистрировано увеличение Mn-Mn расстояния на 0.1 – 0.15Å и уменьшение Mn-Ca расстояния на 0.1Å при переходе S2 – S3.

Объяснение: окисляется кислород общего μ -O мостика.



- ◆ Скорость переноса электрона между катионами марганца внутри кластера существенно ниже скорости изменения S состояний, т. е. накопленный катионом марганца окисляющий потенциал не рассеивается.

Помимо S_0 - S_4 состояний могут существовать также “искусственные” состояния S_{-1}, S_{-2} . Эти состояния появляются при добавлении восстановителей (гидроксиламин, гидразин) в результате частичного восстановления марганцевого кластера до состояния превышающего его степень восстановленности в состоянии S_0 . Например,

Mn(II), Mn(III), Mn(IV), Mn(IV)



Mn(II), Mn(II), Mn(IV), Mn(IV)

Кальций в КВК

- ◆ КВК содержит 1 катион кальция, являющийся элементом каталитического центра.
- ◆ Кальций экстрагируется либо при удалении периферических белков 23, 16 KDa, либо при действии низких pH (pH 3,0).
- ◆ В стабилизации кальция принимает участие периферический белок 23 кДа.
- ◆ В связывании кальция принимает участие D1-D170 и D1-A344 полипептида D1 реакционного центра.
- ◆ Экстракция кальция блокирует переход КВК из S2 состояния в S3 (фактически в состоянии S2Yz').

Роль кальция:

- ◆ а)структурная;
- ◆ б)химическая (кальций связывает одну из молекулу воды). **См. Таблицу.**
- ◆ в)регулятор редокс потенциала марганца

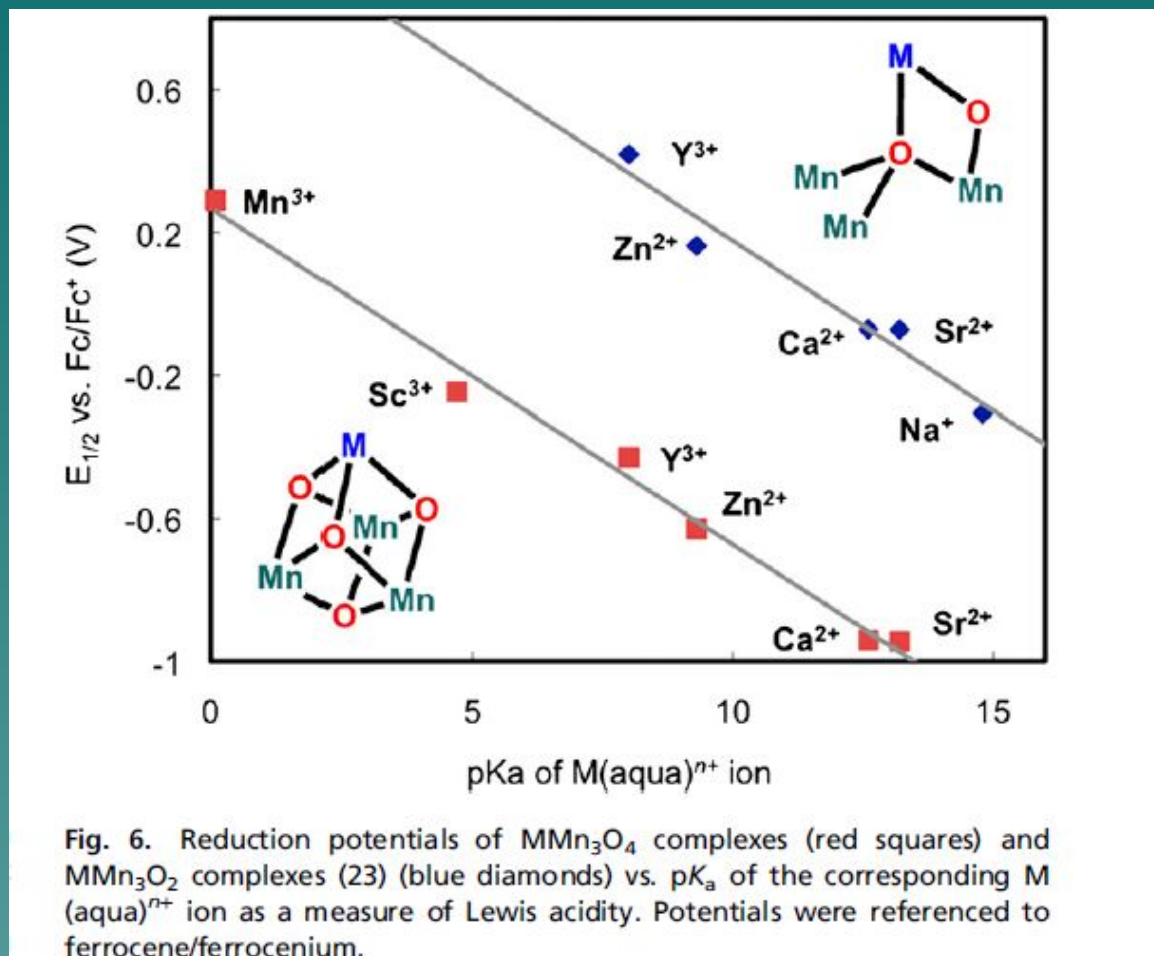
Table 1. Ionic radii and pK_a s of the aqua ions of metal cations.

metal ion	ionic radius ($\text{\AA}$) ^a	pK_a of aqua ion ^b
<i>monovalent cations</i>		
Na^+	0.97	14.77
K^+	1.33	16
Cs^+	1.67	> 17
<i>divalent cations</i>		
Mg^{2+}	0.66	11.41
Ni^{2+}	0.69	9.86
Cu^{2+}	0.72	8.00
Co^{2+}	0.72	9.85
Cd^{2+}	0.97	9.00
Ca^{2+}	0.99	12.80
Sr^{2+}	1.12	13.18
Ba^{2+}	1.34	13.36
<i>trivalent cations</i>		
Lu^{3+}	0.85	7.94
Dy^{3+}	0.91	8.10
Gd^{3+}	0.92	9.78
Pr^{3+}	1.01	8.91
La^{3+}	1.02	8.82

рК может снижаться на несколько единиц в гидрофобном окружении.

Brudvig, 2008

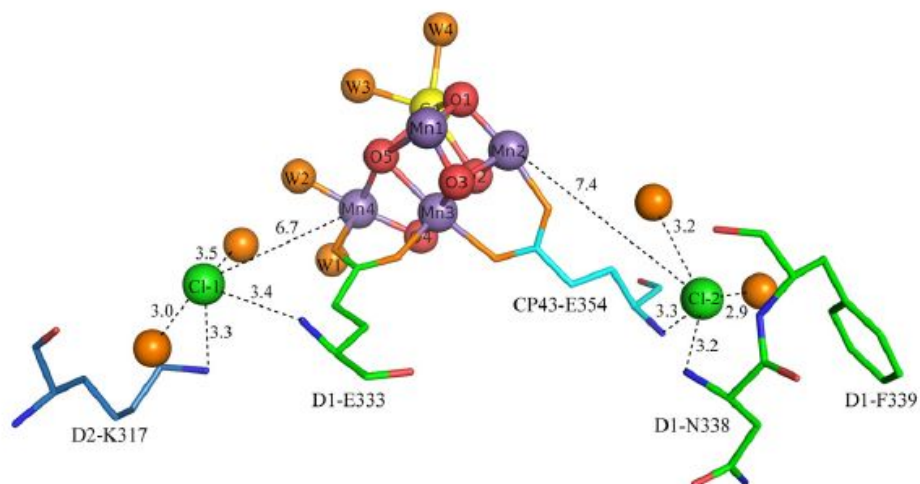
Кальций регулирует редокс потенциал марганцевого кластера



Хлор в КВК

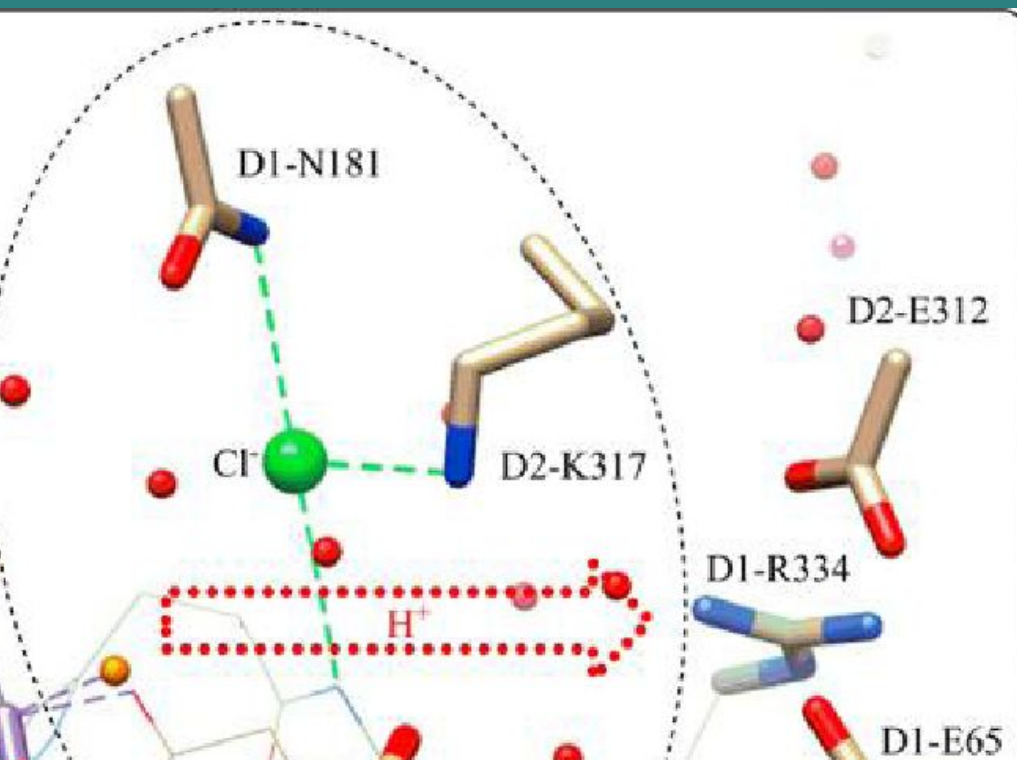
- ♦ Удаление хлора ингибирует работу КВК приблизительно на 60%. Добавление хлора восстанавливает работу КВК. Br^- и I^- также восстанавливают активность, но в меньшей степени, чем Cl^- . F^- является антагонистом хлора.
- ♦
- ♦ Количество анионов хлора в КВК – 2 аниона хлора находятся вблизи марганцевого кластера, однако в работе КВК, возможно участвует только один – Cl-1 .
- ♦ Анионы хлора НЕ СВЯЗАНЫ с катионами марганца или кальция.

K. Kawakami et al / Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 104 (2011) 9–18



Хлор в КВК

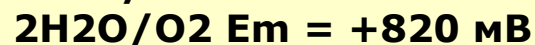
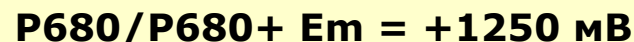
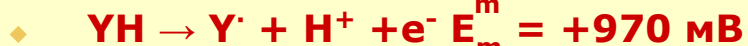
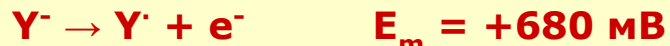
- ♦ Анион хлора необходим для перехода марганцевого кластера из S2 в S3 состояние и из состояния S3 в S0.
- ♦ Возможная роль – 1) транспорт воды к КВК; 2) транспорт протонов из КВК; 3) стабилизация координационной структуры КВК; 4) гипотеза Brudvig et al [Pokhrel et al, 2011].



Анион Cl-1 связывается с D2-K317, предотвращая формирование солевого мостика между D2-Lys317 и D1-Asp61, обеспечивая тем самым эффективное удаление протона из КВК аминокислотным остатком D1-D61 и функционирование протонного канала, по которому отводятся протоны от КВК

Тирозин в КВК

- ◆ ЭПР исследования тирозина Z показали, что при окислении тирозина образуется нейтральный радикал тирозина.
- ◆ Это означает, что при окислении тирозин теряет не только электрон, но и протон.
- ◆ Объясняется данный факт величинами рК и редокс потенциала различных форм тирозина:



Потеря протона при окислении может происходить через имеющую место водородную связь между фенольной группой тирозина и акцептором протона (гистидин D1-His190).

- ◆ То есть, в ФС2 на ее донорной стороне должен существовать помимо электронного канала и протонный канал.



Периферические белки КВК

- ◆ Периферические белки PsbO, PsbP и PsbQ (высшие растения и водоросли) закрывают каталитический центр КВК, защищая его от атаки восстановителями, хелаторами и т.д..
- ◆ Периферические белки не участвуют в связывании катионов марганца и кальция.
- ◆ Периферические белки формируют каналы для выведения протонов и кислорода и для доставки молекул воды к каталитическому центру.
- ◆ PsbO белок стабилизирует марганцевый кластер. Без этого белка марганцевый кластер разрушается.
- ◆ Белки PsbP и PsbQ стабилизируют катион кальция и анионы хлора.