

## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ РАСТВОРИМОГО И ИММОБИЛИЗОВАННОГО МАРГАНЕЦ-СТАБИЛИЗИРУЮЩЕГО БЕЛКА PsbO С ИОНАМИ Mn И ИЗОЛИРОВАННЫМ КОМПЛЕКСОМ D1-D2-cyt b<sub>559</sub> РЕАКЦИОННОГО ЦЕНТРА ФС II

© 2023 г. М. С. Христина<sup>а</sup>, Т. Н. Смолова<sup>а, \*</sup>

<sup>а</sup> Институт фундаментальных проблем биологии Российской академии наук — обособленное подразделение  
Федерального исследовательского центра Пушинский научный центр биологических исследований  
Российской академии наук, Пушкино, Россия

\*e-mail: smolova\_20@rambler.ru

Поступила в редакцию 01.06.2022 г.

После доработки 22.06.2022 г.

Принята к публикации 01.07.2022 г.

Исследовали взаимодействие водорастворимого и иммобилизованного на BrCN-активированной агарозе марганец-стабилизирующего белка PsbO с катионами Mn<sup>2+</sup>, Mn<sup>3+</sup> и препаратами реакционного центра D1-D2- cyt b<sub>559</sub> (РЦ) фотосистемы II (ФС II). Методом электрофореза в нативных условиях установлено образование димера и агрегированной формы белка PsbO в присутствии ионов Mn<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> и Fe<sup>2+</sup>. Димеризация PsbO наблюдалась после облучения УФ-светом препарата белка. Электростатическое взаимодействие иммобилизованного PsbO с РЦ возрастает в присутствии катионов Mn<sup>3+</sup>, связанных с белком, о чем свидетельствует увеличение концентрации CaCl<sub>2</sub>, необходимой для диссоциации комплекса PsbO-РЦ. Впервые показаны СОД-активность белка в ПААГ после электрофореза при инкубации геля с раствором катионов Mn<sup>3+</sup> и тетразолий-редуктазная активность после электрофореза белка в смеси с препаратами кислород-выделяющего хлорофилл-белкового комплекса (КВК). Предполагается, что взаимодействие белка с ионами Mn в присутствии O<sub>2</sub>, а также кратковременное облучение УФ-светом восстанавливают тирозин и дисульфидную связь белка PsbO с образованием радикала тирозила и SH-групп, которые участвуют в редокс-реакциях с компонентами ЭТЦ. Взаимодействие PsbO с ионами Mn и УФ-светом в тилакоидах хлоропластов может регулировать его связывание с РЦ, изменять структурную организацию белка и способствовать его участию в альтернативных путях электронного транспорта при воздействии стрессовых факторов. Обсуждается гипотетическая схема взаимодействия иммобилизованного белка PsbO с ионами Mn и РЦ.

**Ключевые слова:** *Pisum sativum*, белок PsbO, кислород-выделяющий хлорофилл-белковый комплекс, марганец, реакционный центр, фотосистема II

**DOI:** 10.31857/S0015330322600383, **EDN:** ALUOKO

### ВВЕДЕНИЕ

Водорастворимый периферический PsbO белок ФС II стабилизирует водоокисляющий 4-атомный марганцевый комплекс (ВОК) [1]. Установленным фактом считается разрушение 4-атомного марганцевого ВОК, связанное с удалением белка PsbO из мембран ФС II с помощью буфера 0.8 М Трис-HCl при pH 8.4 [2]. Обработка тилакоидных мембран NaCl-мочевинной удаляет из ФС II поло-

вину марганца и белок PsbO, но не полностью разрушает ВОК [3]. Зависимость совместного удаления из мембран ФС II белка PsbO и ионов Mn<sup>3+</sup> от предварительного окисления Mn<sup>2+</sup> до Mn<sup>3+</sup> с помощью добавок окислителей в отмывающие растворы [4], свидетельствует о влиянии редокс-состояния этого металла на связывание с PsbO. Известно, что ионы Mn<sup>2+</sup> влияют на конформацию белка при pH-титровании [5]. Однако остается открытым вопрос о возможном влиянии ионов металла на взаимодействие белка с реакционным центром D1-D2-cyt b<sub>559</sub> (РЦ) ФС II. Пока нет четких представлений о возможной роли связывания ионов Mn с белком PsbO в формировании ВОК. Не до конца изучен механизм марганец-стабили-

**Сокращения:** ВОК — водоокисляющий 4-атомный марганцевый комплекс, КВК — кислород-выделяющий хлорофилл-белковый комплекс, НСТ — нитросиний тетразолий хлорид, РФ — рибофлавин, ТМФД — 2,3,5,6-тетраметил-*p*-фенилендиамин, ФМС — феназинметасульфат, ФЦ — феррицианид калия.

зирующей функции белка. Экспериментальные данные [6] с использованием мутаций белка являются доказательством защитной роли двух молекул PsbO от восстановителей марганца со стороны люмена. Вопрос о возможном димере PsbO *in vivo*, таким образом, остается актуальным. Остается также открытым вопрос о супероксиддисмутазной (СОД) активности PsbO. Ранее [7] на основании некоторого структурного сходства PsbO и СОД предполагалось наличие такой активности у белка PsbO. Однако данные, подтверждающие или опровергающие эту гипотезу, в литературе пока отсутствуют.

Настоящая работа посвящена исследованию взаимодействия белка PsbO с ионами Mn, комплексом РЦ ФС II, СОД-активности белка, связанного с Mn, и его димеризации.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали тритон X-100 ("Panreac", Испания), Mes, Трис, *n*-додецил- $\beta$ -D-мальтозид, реактивы для электрофореза фирмы "Sigma" (США), TSK-гель DEAE-Toyopearl 650S фирмы "TOSON" (Япония), CNBr-активированную агарозу фирмы "GE Healthcare", нитросиний тетразолий хлорид (НСТ) фирмы "AppliChem", акрилекс Р-4 "Reanal" (Венгрия), остальные реактивы квалификации х. ч. были произведены в России.

Кислород-выделяющие мембраны ФС II (BBY) получали из хлоропластов гороха (*Pisum sativum* L.) с помощью тритона X-100, как описано ранее [8]. Кислород-выделяющий комплекс (КВК) и препараты РЦ получали из мембран по методу, описанному в нашей статье [9].

Экстракцию белка PsbO проводили последовательной обработкой мембран ФС II растворами 1 М NaCl и 1 М CaCl<sub>2</sub> в 50 мМ Трис-HCl буфере (pH 7.0), содержащем 0.3 М сахарозы при 4° на слабом свете. Полученный экстракт белка диализовали дважды по 5 ч против 10 мМ MES-буфера (pH 6.8), содержащего 10 мМ NaCl и 2 мМ ЭДТА, а затем концентрировали на ячейке Amicon (США).

Электрофоретически гомогенный белок PsbO иммобилизовали на CNBr-агарозе. Для этого 0.2 мг/мл белка инкубировали с BrCN-агарозой в 0.15 М Трис-HCl буфере (pH 8.5) с 0.2 М NaCl в течение 10 ч при 0°. Непрореагировавшие с белком активные группы нейтрализовали 0.2 М  $\alpha$ -аминокапроновой кислотой при pH 8.5. В 1 мл агарозы содержалось 0.025 мг иммобилизованного белка PsbO. Агарозу-PsbO вносили в хроматографическую колонку и проводили аффинную хроматографию препаратов РЦ. Для исследования влияния ионов Mn<sup>3+</sup> на взаимодействие белка с РЦ колонку последовательно промывали раствором, содержащим 5 мМ MnCl<sub>2</sub>, 5 мМ феррицианида калия (ФЦ) и 5 мМ 2,3,5,6-тетра-

метил-*p*-фенилендиамина (ТМФД) в 20 мМ Mes-NaOH (pH 6.5), уравнивали препаратом комплекса РЦ, а затем элюировали градиентом концентрации CaCl<sub>2</sub>.

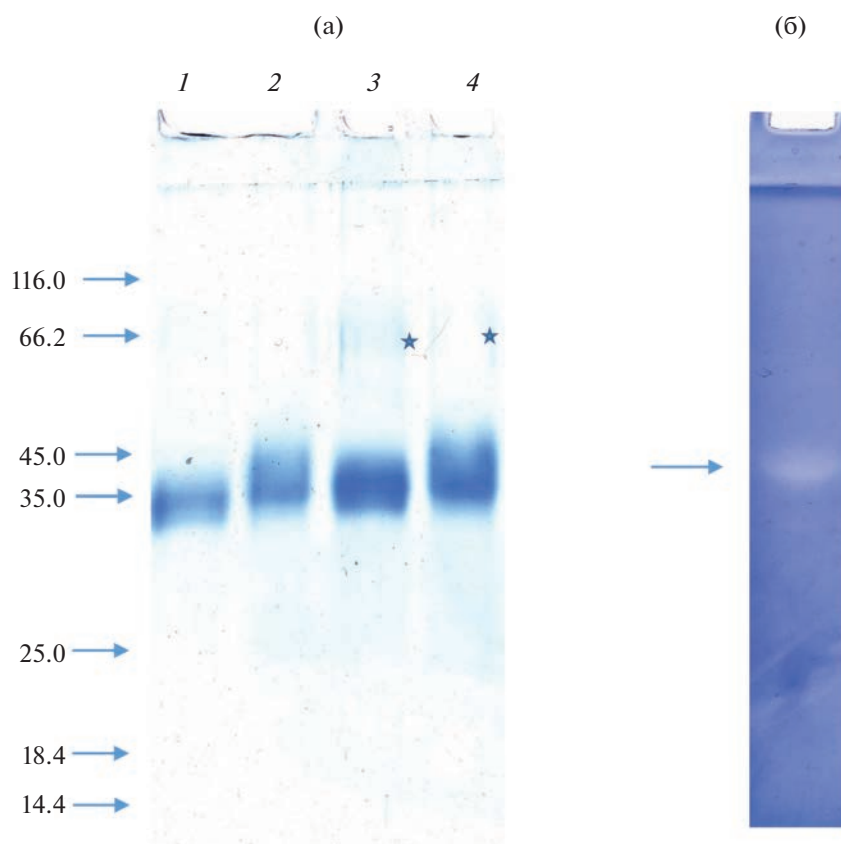
Взаимодействие ионов Mn<sup>2+</sup> с белком PsbO изучали также электрофорезом в нативных условиях, используя 15% ПААГ. Кроме ионов Mn<sup>2+</sup> использовали Mg<sup>2+</sup> и Fe<sup>2+</sup>. Электрофорез в денатурирующих условиях проводили в градиентном 7–15% ПААГ, содержащем 0.1% ДДС. Верхний электродный Tris-глициновый буфер (150 мМ, pH 8.3) содержал 0.1% ДДС. Для изучения связывания ионов Mn с белком в таких гелях, последний после завершения электрофореза отмывали от мочевины и ДДС, инкубировали 30 мин в 20 мМ Mes-NaOH (pH 6.5) с добавкой 20 мкМ Mn<sup>2+</sup>, 5 мкМ ФЦ, 10 мкМ ТМФД, не связавшийся с белком металл отмывали той же буферной смесью. Гели инкубировали 20 мин в смеси, содержащей ТЕМЕД (20 мкМ), ЭДТА (5 мкМ), РФ (20 мкМ) и 50 мкМ нитросинего тетразолия хлорида (НСТ), после чего освещали 5–8 мин люминесцентной лампой ЛЛ 36 W/640 36 w. Зона в геле, содержащая белок PsbO + Mn<sup>3+</sup>, не окрашивалась при освещении, что свидетельствовало о супероксиддисмутазной активности (СОД) [10].

Образование димера белка PsbO с участием дитирозина определяли спектрофлуориметрически [11, 12]. Флуоресценцию дитирозина в препарате белка после облучения УФ-светом сравнивали с флуоресценцией дитирозина при облучении раствора тирозина [13].

Спектры флуоресценции регистрировали с помощью спектрофлуориметра Hitachi-850 (Япония).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

На рис. 1а представлены электрофореграммы исходного препарата белка PsbO (дорожка 1), предварительно инкубированного с 2-меркаптоэтанолом (2МЕ) (дорожка 2), Mn<sup>2+</sup> (дорожка 3) и 2МЕ + Mn<sup>2+</sup> (дорожка 4), полученные с помощью SDS-PAGE электрофореза. Оказалось, что 2МЕ влияет на форму белковой полосы мономера. Последняя разделяется на две полосы: менее подвижную – восстановленную, и более подвижную – окисленную формы белка. Этот результат согласуется с литературными данными [14]. Интересным оказалось обнаружение дополнительной белковой зоны в опыте с Mn<sup>2+</sup> (дорожка 3) и ее исчезновение, если вместе с Mn<sup>2+</sup> был добавлен 2МЕ. Молекулярная масса белка в этой полосе соответствует димеру (66 кДа). Влияние 2МЕ на ее интенсивность свидетельствует о межмолекулярной дисульфидной ковалентной связи, образованной в гомодимере PsbO.



**Рис. 1.** (а) SDS-PAGE электрофорез белка PsbO. 1 – контроль, PsbO, 15 мкМ; 2 – PsbO + 2-ME, 150 мкМ; 3 – PsbO +  $Mn^{2+}$ , 2 мкМ; 4 – PsbO +  $Mn^{2+}$ , 2 мкМ + 2-ME, 150 мкМ; звездочкой показан димер белка PsbO. (б) СОД-активность (зона показана стрелкой) белка PsbO, связанного с ионами  $Mn^{2+}$ .

На основании некоторого структурного сходства вторичной структуры молекул PsbO и СОД предполагалось [7], что белок PsbO может обладать СОД-активностью. Однако в литературе экспериментальное подтверждение этого предположения мы не обнаружили. Нам известна работа [15], в которой электрофоретически гомогенный препарат белка PsbO, выделенный из *Capsosiphon fulvescens* характеризуется как сильный антиоксидант, обладающий СОД-активностью. Остается неизвестным, какой металл содержится в активном центре белка PsbO из этого организма.

Так как механизм марганец-стабилизирующей функции в КВК остается невыясненным, и нельзя полностью исключить вклад взаимодействия ионов Mn с PsbO, мы попытались в опытах *in vitro* моделировать СОД-активность белка. Раствор белка 25 мкМ в 20 мМ Mes-буфере (pH 6.5) инкубировали отдельно с ионами  $Mn^{2+}$  и  $Mn^{2+}$  + ФЦ + ТМФД, а несвязавшиеся ионы отделяли хроматографией на колонке биогеля Р-6. Комплекс белка PsbO с  $Mn^{3+}$  элюировался из колонки в первой фракции, свободный Mn – в последней фракции, что свидетельствовало о прочном свя-

зывании ионов  $Mn^{3+}$  с белком. Ионы  $Mn^{2+}$  не обнаруживались с белком PsbO по спектру в УФ-области поглощения. Однако комплекс белка с  $Mn^{3+}$ , разделяемый в ПААГ не показывал СОД-активность, если ее определять в гелях (данные не представлены). Вероятно, утрата ионов  $Mn^{3+}$  происходит в ПААГ при электрофорезе и связана с восстановлением до  $Mn^{2+}$ , что имеет место в марганцевом кластере при добавке к препаратам КВК восстановителей. Таким образом, было предположено, что комплекс белка с ионами металла нестабилен в условиях электрофореза. Это предположение было подтверждено в опытах с добавлением ионов Mn к белку после электрофореза. Гели с белком инкубировали в 20 мМ Mes-буфере (pH 6.5) с добавкой 20 мкМ  $Mn^{2+}$ , 5 мкМ ФЦ, 10 мкМ ТМФД. Не связавшийся с белком Mn отмывали от гелей 3-кратной инкубацией в 50 мМ Mes-NaOH (pH 6.5) и затем по методу [10] определяли СОД-активность PsbO. На рис. 1б на темном фоне восстановленного НСТ видна одна неокрашенная зона (показана стрелкой) СОД-активного белка, соответствующая молекулярной массе мономера PsbO.

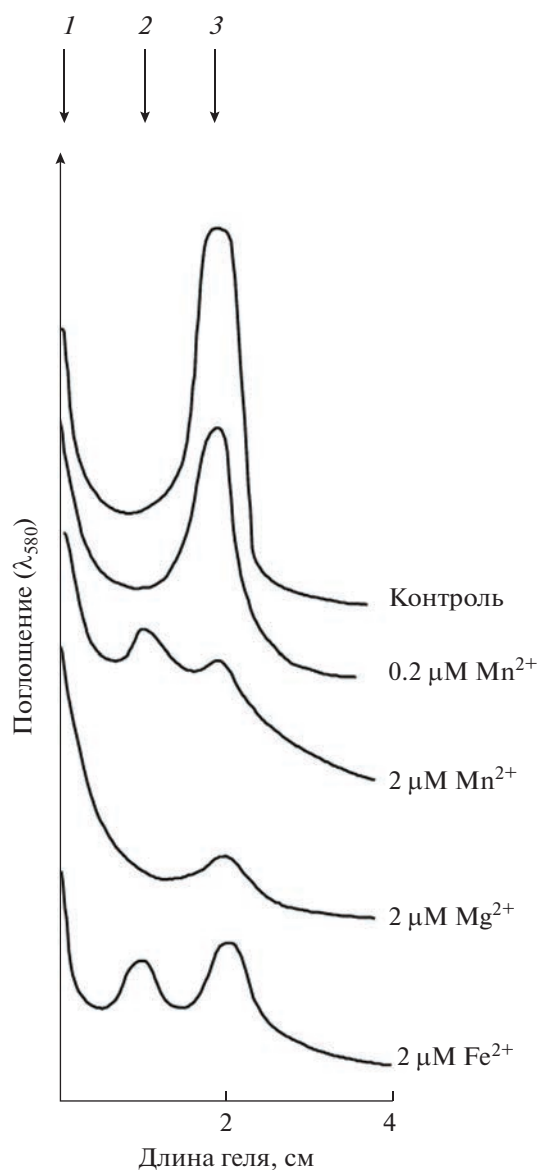


Рис. 2. Денситограммы гелей после нативного электрофореза в 15% ПААГ белка PsbO. 1 – агрегаты белка на старте геля, 2 – димер белка, 3 – мономер белка.

Взаимодействие ионов металлов с белками можно исследовать различными методами, один из которых – металл-аффинный электрофорез в ПААГ [16]. В данном исследовании был использован метод нативного электрофореза в ПААГ.

На рис. 2 представлены денситограммы гелей, в которых проводили разделение смеси белка PsbO с ионами  $Mn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  и  $Fe^{2+}$ . Видно, что ионы используемых металлов, добавленные перед электрофорезом, влияют на количество мономера и димера белка PsbO. Сумма площади (отражающей количество белка) мономера и димера (образующегося в присутствии ионов  $Mn^{2+}$  и  $Fe^{2+}$ ) при добавке ионов металлов к белку перед электрофорезом

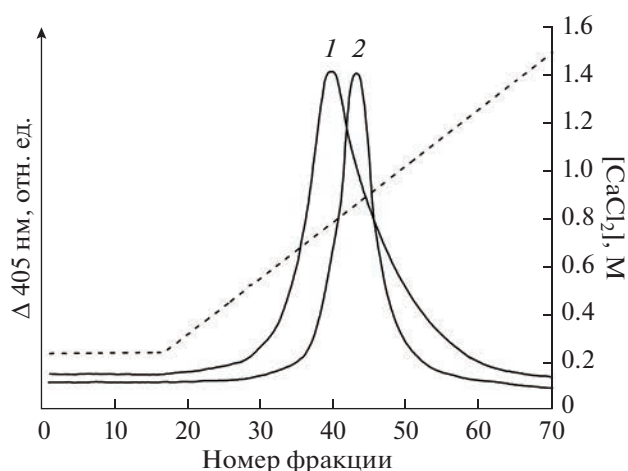
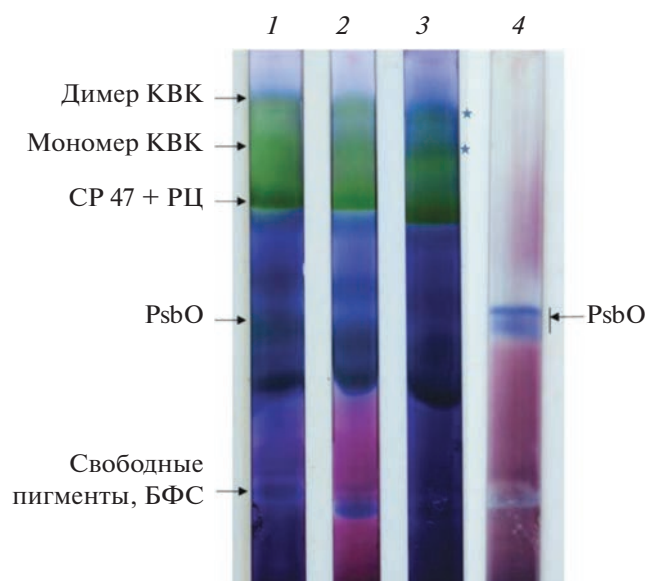


Рис. 3. Хроматограмма элюирования с аффинной колонки комплекса D1/D2/cyt  $b_{559}$  реакционного центра ФС II в отсутствие (1) и в присутствии (2) ионов  $Mn^{3+}$  (5 мкМ). Комплекс D1/D2/cyt  $b_{559}$  РЦ ФС II наносили на колонку агарозы с иммобилизованным белком PsbO.

меньше, чем площадь полосы белка в контрольном опыте (без добавок). Это можно объяснить образованием не только димера, но и агрегатов, которые осаждаются на старте гелей (1). Как видно из рис. 2, максимальной агрегирующей активностью обладают ионы  $Mg^{2+}$  по сравнению с ионами  $Mn^{2+}$ . Димеризация белка наблюдается не только в присутствии  $Mn^{2+}$ , но также ионов  $Fe^{2+}$ . Кроме того, белок PsbO при взаимодействии с ионами металлов частично агрегирует, что можно объяснить металл-хелатирующим эффектом, который используется в методе аффинного металл-электрофореза [16].

Результаты исследования взаимодействия PsbO с  $Mn^{2+}$  позволяют предполагать влияние  $Mn^{2+}$  на конформацию белка. Об этом свидетельствует димеризация белка и изменение электрофоретической подвижности мономера. Возможно, ионы  $Mn^{2+}$  регулируют взаимодействие PsbO с РЦ. Экспериментально проверить это предположение возможно хроматографией препарата РЦ с помощью аффинной колонки агароза-PsbO.

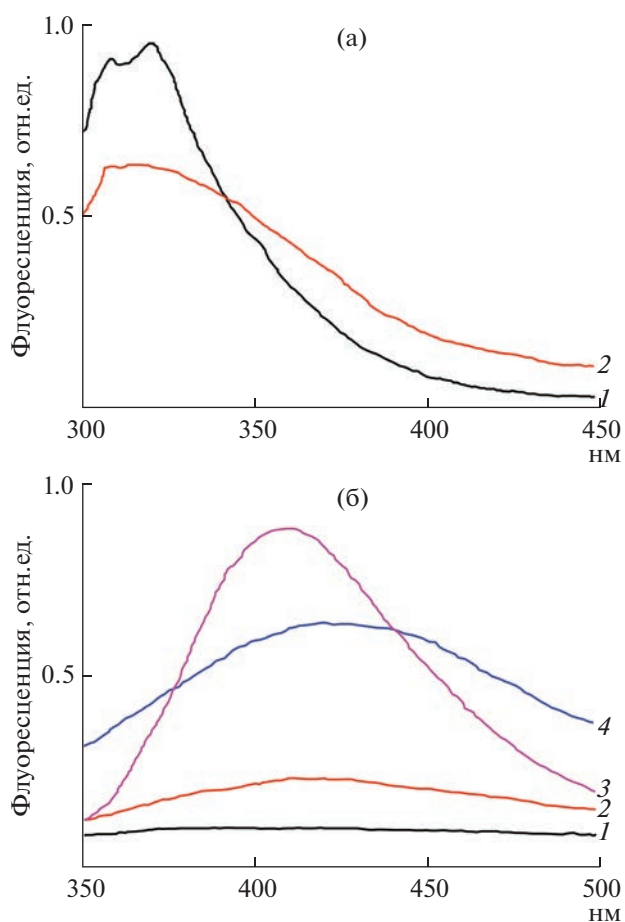
На рис. 3 представлены профили элюирования РЦ с колонки. Можно видеть, что в опыте без добавления ионов Mn (рис. 3, хроматограмма 1) комплекс элюируется в виде одного хроматографического пика. В опыте с последовательным внесением в колонку ионов Mn в присутствии ФЦ и ТМФД, затем препарата РЦ наблюдается более высокая концентрация  $CaCl_2$ , при которой комплекс РЦ-PsbO диссоциирует, при этом равновесие сдвигается в сторону свободного РЦ, и он вымывается из колонки (хроматограмма 2).



**Рис. 4.** СOD- и редуктазная активность Core PS II и белка PsbO. Электрофорез в нативных условиях, 7% ПААГ с дерифатом-160 и ДМ. 1 – Core PS II, контроль; 2 – Core PS II + ЭДТА; 3 – Core PS II + PsbO; 4 – PsbO (фракции нативного и окисленного белка). Звездочкой показано связывание белка PsbO с Core PS II. БФС – бромфеноловый синий.

Взаимодействие PsbO с ионами Mn и белковыми компонентами РЦ было нами исследовано методом нативного электрофореза КВК в ПААГ (рис. 4). К препарату КВК перед электрофорезом добавляли 50 мкМ ЭДТА и хроматографировали на колонке акрилекс Р-4 для удаления металлов. Эффект ЭДТА проявляется уменьшением интенсивности синей окраски (гель 2) после инкубации гелей в растворе, содержащем ТЕМЕД, РФ, ФМС, и последующего освещения люминесцентной лампой. Это может свидетельствовать об ингибировании редуктазной (свето-индуцированное восстановление НСТ) активности в хлорофилл-белковых зонах суперкомплексов КВК (обозначено), вероятно, в результате хелатирования ионов Mn добавкой ЭДТА. На рис. 4 (гель 3) видно возрастание интенсивности восстановленного НСТ в зонах суперкомплексов КВК, к препарату которого перед электрофорезом были добавлены ЭДТА, белок PsbO и  $Mn^{2+}$ .

Взаимодействие мономера PsbO с ионами  $Mn^{2+}$ , как видно из рис. 1а (3), влияет на его электрофоретическую подвижность в ПААГ: белковая полоса мономера разделяется на две в присутствии ионов Mn. Похожий эффект наблюдается и при обработке препарата белка 2МЕ (рис. 1а (2)). Можно заключить, что одна из двух полос образуется в результате восстановления дисульфидной связи мономера. Восстановленный с помощью 2МЕ, либо ДТТ белок, как оказалось, проявлял



**Рис. 5.** (а) Изменение спектра флуоресценции препарата белка PsbO до (1) и после (2) генерации супероксидных радикалов системой РФ-ТЕМЕД-ФМС- $O_2$ , освещение УФ-светом 2 мин.  $E_x = 296$ ,  $E_m = 305$  нм. (б) Флуоресценция препарата (1 мг/мл) белка PsbO (2, 4) и тирозина (1, 3) до (1, 2) и после (3, 4) освещения УФ-светом (2 мин).  $E_x = 325$ ,  $E_m$  от 350 нм.

цитохром *c*-550- и ДХФИФ-оксидазную активность (данные не представлены), стимулируемую освещением препарата белка УФ-светом. Возможно, активными сайтами, восстанавливающими цитохром, являются сульфгидрильные группы, которые образуются из дисульфидной связи при поглощении УФ-света белком [17].

Флуоресценция препарата PsbO до и после облучения УФ-светом дает дополнительную информацию к данным электрофореза в ПААГ об изменении нативной структуры и природе связи в димере белка. Так, на рис. 5а представлены спектры флуоресценции препарата до (1) и после (2) облучения УФ-светом. Величина максимума флуоресценции снижается при 310 нм (возбуждение флуоресценции длиной волны 296 нм, где поглощает Trp), что свидетельствует об изменении конформации белка [18].

На рис. 5б представлены спектры флуоресценции препарата белка PsbO до (2) и после (4) и рас-

твор Тир до (1) и после (3) облучения УФ-светом. Видно, что в спектре флуоресценции при возбуждении светом 340 нм обнаруживается максимум 410 нм, свидетельствующий об образовании дитиозиновой ковалентной связи в димере белка PsbO.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Мембраны ФС II, выделенные из тилакоидов высших растений, при освещении белым светом выделяют кислород в присутствии искусственных акцепторов электронов. Активность ингибируется обработкой мембран 0.8 М Трис-НСl (рН 8.4), либо 1М CaCl<sub>2</sub>, так как от мембран отмываются водорастворимые белки и ионы Mn. Инкубация таких мембран с препаратом белка PsbO, ионами Mn<sup>2+</sup>, Cl<sup>-</sup>, Ca<sup>2+</sup> частично восстанавливает активность [19–21]. Восстановление активности выделения кислорода добавками изолированного PsbO, ионов Mn<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Cl<sup>-</sup> является удобной моделью для исследования механизмов марганец-стабилизирующей функции PsbO белка. Белок при этом возможно предварительно химически модифицировать, и таким образом, изучить роль отдельных аминокислот в стабилизации марганцевого кластера [22, 23]. Эта же задача успешно решается методами мутагенеза [6].

В нашей работе исследовано взаимодействие иммобилизованного белка PsbO с ионами Mn<sup>2+</sup> и препаратом РЦ. Аффинная хроматография препаратов РЦ на иммобилизованном белке PsbO позволяет исследовать влияние ионов Mn на взаимодействие белка с РЦ и, таким образом, моделировать взаимодействие белка с ионами Mn<sup>2+</sup> и хлорофилл-белковым комплексом (ХБК) РЦ. Результаты связывания РЦ с иммобилизованным белком согласуются с литературными данными [24, 25]. Оказалось, что прочность связывания иммобилизованного белка с РЦ зависит от степени окисления Mn. Для окисления Mn<sup>2+</sup> до Mn<sup>3+</sup> необходимо в колонку с иммобилизованным белком вносить окислители, затем элюировать препарат РЦ градиентом концентрации CaCl<sub>2</sub>. Результаты показали, что ионы Mn<sup>3+</sup>, связанные с белком, влияют на элюирование РЦ из колонки, что наблюдается задержкой выхода препарата из колонки (рис. 3, кривая 2) по сравнению с контролем (рис. 3, кривая 1). Возможно, эффект Mn связан с изменением электростатических и гидрофобных взаимодействий белка с РЦ. Как известно [4], ионы Mn<sup>3+</sup> в присутствии ФЦ и ТМФД вымываются из мембран ФС II вместе с PsbO. При этом Mn<sup>3+</sup> более прочно связывается с белком, чем Mn<sup>2+</sup>. Можно предположить, что ионы Mn<sup>3+</sup> увеличивают электростатические и гидрофобные силы взаимодействия белка с РЦ.

В связывании катионов Mn<sup>3+</sup> с PsbO могут принимать участие глутаматные и аспартатные остатки аминокислот, расположенные на поверхности β-спирали (бочонка). Они также участвуют в транспорте протонов из ВОК в люмен [26, 27]. Вероятно, связанные с белком ионы Mn в мембранах ФС II активируют СОД, а по данным [28, 29] карбоангидразную активность белка PsbO. Можно предположить, что СОД-активность PsbO белка защищает и стабилизирует D1-D2 / cyt b559 от инактивации, так как в этом комплексе генерируются супероксидные радикалы [30]. Супероксидные радикалы реагируют с ионами Mn, связанными с PsbO (рис. 4) и с Тир белка [31], что подтверждается изменением флуоресценции Тир в белке в условиях фотохимического образования радикалов O<sub>2</sub> (рис. 5).

Так как в используемой нами модели белок PsbO был пришит к BrCN-агарозе, можно исключить его внутрибелковые модификации в процессе иммобилизации. Это является существенным, учитывая физико-химическую природу белка, имеющего неупорядоченную внутреннюю структуру, которая претерпевает светоиндуцированные конформационные изменения, связанные с редокс-изменениями атомов Mn в ВОК [32]. Ковалентные внутрибелковые сшивки аминокислотных остатков белка PsbO приводят к неспособности восстановления кислород-выделяющей функции ФС II [33] и утрате динамического кислотно-основного гистерезиса [5].

Возрастание прочности связывания иммобилизованного PsbO-белка с РЦ в присутствии ионов марганца, хотя и косвенно, подтверждается эффектом увеличения в 6 раз константы связывания (K<sub>a</sub>1) PsbO в опытах с мембранами ФС II, содержащими 4, 2 и 0 ионов Mn по данным, полученным в лаборатории Т.М. Bricker [34], а также доказанной ролью белка PsbO в светоиндуцированной модуляции встраивания ионов Mn<sup>2+</sup> в ФС II [35].

Локализация ионов Mn на иммобилизованном белке PsbO отличается от структурной организации ионов Mn в КВК. К тому же, белок не имеет прямого контакта с марганцевым кластером в ФС II [32]. Однако нельзя полностью исключить роль редокс-изменений атомов Mn в КВК, влияющих на конформацию PsbO-белка [27], и дальнего действующего эффекта PsbO на структуру и функции КВК [32]. Важно также, что в исследуемой нами системе (PsbO + Mn<sup>3+</sup> + D1-D2-цитохром b<sub>559</sub>) отсутствует антенный белок 47 кДа, который связывается с PsbO и участвует в организации Mn в КВК [36].

Оценивая полученные нами данные, можно заключить, что модельная система, включающая иммобилизованный PsbO-белок, РЦ и атомы Mn, позволяет изучать альтернативные механизмы

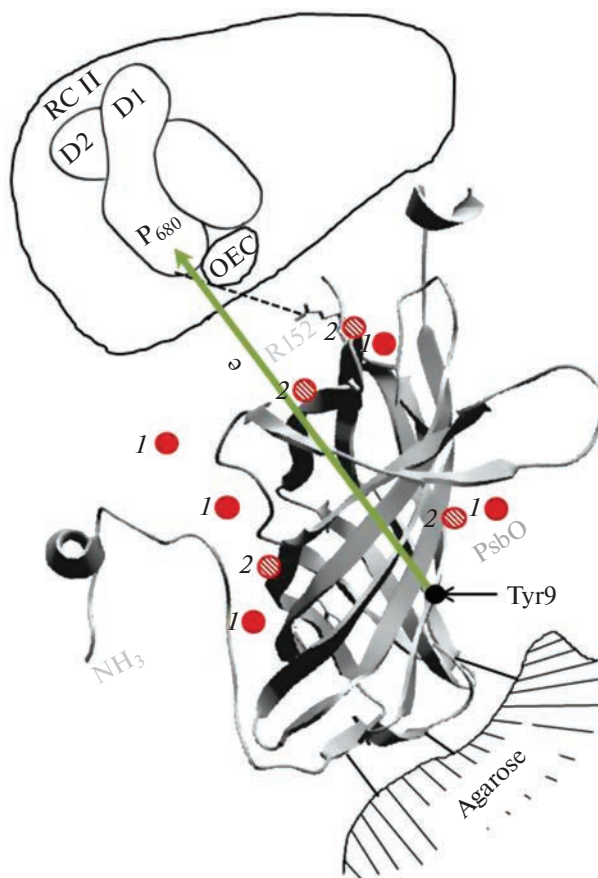
взаимодействия ионов  $Mn$  с белком  $PsbO$ , активируемыми стрессовыми факторами.

На рис. 6 представлена гипотетическая схема взаимодействия иммобилизованного  $PsbO$  белка с РЦ ФС II и ионами  $Mn^{3+}$ . Согласно схеме, поверхностные группы аминокислотных остатков белка  $PsbO$  связаны ковалентной связью с агарозой. Аминокислоты внутренней неупорядоченной структуры белка не принимают участие в связывании с агарозой. Атомы  $Mn^{3+}$  взаимодействуют с аминокислотными остатками глутамата и аспартата  $\beta$  — структуры белка  $PsbO$ , и могут участвовать в альтернативной ЭТЦ [37]. Мы предполагаем, что белок  $PsbO$  в мембранах ФС II поддерживает ионы  $Mn$  в окисленной форме  $Mn^{3+}$ , и таким образом выполняет марганец-стабилизирующую функцию.

Известно, что изолированный белок  $PsbO$  в присутствии ионов  $Cl^-$ ,  $O_2$  и 2МЕ проявляет  $Mn$ -оксидазную активность [38]. Поэтому нельзя исключить в условиях *in vivo* формирование  $Mn^{3+}$  с участием белка и последующего включения  $Mn^{3+}$  в 4-атомный кластер. Ионы  $Mn^{3+}$  могут регулировать взаимодействие  $PsbO$  с РЦ, а также включаться в формирование 4-атомного кластера и таким образом стабилизировать КВК. Димеризация  $PsbO$ -белка может происходить в тилакоидах с участием электростатических взаимодействий и при участии аминокислот Тре и Сер [39], а также при последующем образовании дисульфидной связи в гомодимере белка в результате окислительно-восстановительных реакций и действия УФ-света.

Как показано на рис. 2, димеризация белка  $PsbO$  может иметь место не только при облучении УФ-светом, но и при взаимодействии белка с ионами металлов. Это может происходить в условиях загрязнения почвы тяжелыми металлами. Проникая в люмен тилакоидов, где локализован  $PsbO$ , ионы тяжелых металлов могут индуцировать окислительный стресс, особенно в присутствии восстановителей (например, аскорбиновой кислоты) и таким образом способствовать окислительно-восстановительным превращениям дисульфидной связи белка, что при условии близкого расположения в ФС II двух молекул  $PsbO$  способствует их димеризации. Кроме того, в условиях фотоинактивации ФС II, интенсивное продуцирование супероксидных радикалов, также может изменять структурную ориентацию белка и приводить к его димеризации.

По данным [39], перенос протонов на большие расстояния и специфическое связывание между белками в ФС II облегчаются сетями с водородными связями, которые часто включают более одной белковой субъединицы с участием глутамата и аспартата белка  $PsbO$  на люменальной поверхности ФС II.



**Рис. 6.** Гипотетическая схема взаимодействия иммобилизованного белка  $PsbO$  с ионами  $Mn^{3+}$  и комплексом реакционного центра D1-D2-цит  $b_{559}$ . Учитывая полученные данные с использованием иммобилизованного  $PsbO$ , ионов  $Mn^{3+}$  предполагается регуляция взаимодействия белка с РЦ. В хлоропластах  $Mn$ -оксидазная активность регулируется тиоредоксиновой системой, ионами  $Cl^-$  и  $O_2$  [38]. Нековалентный димер  $PsbO$  [39] в хлоропластах может превращаться в ковалентный путем обратимых редокс-состояний связи. Тир белка  $PsbO$  участвует в альтернативной цепи электронного транспорта в условиях нитрования Тир9 [37]. На схеме использовали трехмерную гомологичную модель  $PsbO$  из цианобактерий [40]. 1 –  $Mn^{2+}$ , 2 –  $Mn^{3+}$ .

Таким образом, при взаимодействии ионов  $Mn$  с растворимым препаратом белка  $PsbO$  может наблюдаться его димеризация и агрегация, а при включении  $Mn$  в иммобилизованный  $PsbO$  может изменяться его взаимодействие с РЦ. Возможно, что белок при взаимодействии с  $Mn^{3+}$ , приобретает СОД-активность, что приводит к стабилизации КВК *in vivo*.

Авторы выражают благодарность в.н.с., к.б.н. А.А. Хоробрых из Института фундаментальных проблем биологии Российской академии наук за обсуждение полученных данных и помощь в оформлении.

Работа выполнена в рамках государственного задания Федерального исследовательского центра Пушинского научного центра биологических исследований Российской академии наук (№ 122041100274-6).

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследования.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kuwabara T., Murata N. An improved purification method and a further characterization of the 33-kilodalton protein of spinach chloroplast // *BBA*. 1982. V. 680. P. 210.
2. Yamamoto Y., Doi M., Tamura N., Nishimura M. Released of polypeptides from highly active  $O_2$ -evolving photosystem-2 preparation by Tris treatment // *FEBS Letters*. 1981. V. 133. P. 265.
3. Miyao M., Murata N. The mode of binding of three extrinsic proteins of 33 kDa, 23 kDa and 18 kDa in the photosystem II complex of spinach // *BBA*. 1989. V. 977. P. 315.  
[https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(89\)80086-6](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(89)80086-6)
4. Yamamoto Y., Shinkai H., Isogai Y., Matsuura K., Nishimura M. Isolation of an Mn-carrying 33-kDa protein from an oxygen-evolving photosystem-preparation by phase partitioning with butanol // *FEBS Letters*. 1984. V. 175. P. 429.
5. Шутова Т.В., Христин М.С., Опанасенко В.К., Анянцев Г.М., Климов В.В. Протон-акцепторные свойства водорастворимого белка 33 кДа фотосистемы 2 шпината // *Биологические мембраны*. 1992. Т. 9. С. 836.
6. Commet A., Boswell N., Yocum C.F., Popelka H. pH optimum of the photosystem II  $H_2O$  oxidation reaction: effects of PsbO, the manganese-stabilizing protein,  $Cl^-$  retention, and deprotonation of a component required for  $O_2$  evolution activity // *Biochemistry*. 2012. V. 51. P. 3808.  
<https://doi.org/10.1021/bi201678m>
7. Pazos F., Heredia P., Valencia A., De las Rivas J. Threading Structural Model of the Manganese-Stabilizing Protein PsbO Reveals Presence of Two Possible b-Sandwich Domains // *Proteins: Structure, Function, and Genetics*. 2001. V. 45. P. 372.
8. Berthold D.A., Babcock G.T., Yocum C.F. A highly resolved, oxygen-evolving photosystem II preparations from spinach thylakoids membranes, EPR and electron-transport properties // *FEBS Lett*. 1981. V. 134. P. 231.
9. Khristin M.S., Nikitishena O.V., Smolova T.N., Zastizhnaya O.M. Extraction of functionally active Photosystem II pigment-protein complexes from pea thylakoids and their purification on Sepharose DEAE 6B // *Biol. Membr. (Moscow)*. 1997. V. 14. P. 133.
10. Beauchamp C., Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels // *Analytical Biochemistry*. 1971. V. 44. P. 276.  
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(71\)90370-8](https://doi.org/10.1016/0003-2697(71)90370-8)
11. Malencik D.A., Anderson S.R. Dityrosine as a product of oxidative stress and fluorescent Oxidative Dimerization at Tyrosine by a Water-Soluble 4-Amino-1,8-naphthalimide // *Chembiochem*. 2021. V. 22. P. 2703.  
<https://doi.org/10.1002/cbic.202100193>
12. Malencik D.A., Anderson S.R. Dityrosine formation in calmodulin: cross-linking and polymerization catalyzed by *Arthromyces* peroxidase // *Biochemistry*. 1996. V. 35. P. 4375.  
<https://doi.org/10.1021/bi9526037>
13. Keyes E.D., Kauser K., Warner K.S., Roberts A.G. Photosensitized oxidative dimerization at tyrosine by a water-soluble 4-amino-1,8-naphthalimide // *ChemBioChem*. 2021. V. 22. P. 2703.
14. Betts S.D., Ross J.R., Hall K.U., Pichersky E., Yocum C.F. Functional reconstitution of photosystem II with recombinant manganese-stabilizing proteins containing mutations that remove the disulfide bridge // *BBA*. 1996. V. 1274. P. 135.  
[https://doi.org/10.1016/0005-2728\(96\)00023-0](https://doi.org/10.1016/0005-2728(96)00023-0)
15. Cao P., Xie Y., Li M., Pan X., Zhang H., Zhao X., Su X., Cheng T., Chang W. Crystal structure analysis of extrinsic PsbP protein of photosystem II reveals a manganese-induced conformational change // *Molecular Plant*. 2015. V. 8. P. 664.  
<https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.01.002>
16. Lee B.-S., Lasanthi G.D., Jayathilaka P., Huang J.-S., Gupta S. One-dimensional and two-dimensional immobilized metal affinity electrophoresis // *Methods Mol. Biol.* 2012. V. 869. P. 275.  
[https://doi.org/10.1007/978-1-61779-821-4\\_23](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-821-4_23)
17. Permyakov E.A., Permyakov S.E., Deikus G.Y., Morozova-Roche L.A., Grishchenko V.M., Kalinichenko L.P., Uversky V.N. Ultraviolet Illumination-induced Reduction of  $\alpha$ -Lactalbumin Disulfide Bridges // *Proteins: Structure, Function, and Genetics*. 2003. V. 51. P. 498.
18. Tanaka S., Kawata Y., Wada K., Hamaguchi K. Extrinsic 33-Kilodalton Protein of Spinach Oxygen-Evolving Complexes: Kinetic Studies of Folding and Disulfide Reduction // *Biochemistry*. 1989. V. 28. P. 7188.
19. Miyao M., Murata N. Effect of urea on Photosystem II particles. Evidence for an essential role of the 33 kilodalton polypeptide in photosynthetic oxygen evolution // *BBA*. 1984. V. 765. P. 253.
20. Kuwabara T., Miyao M., Murata T., Murata N. The function of 33-kDa protein in the photosynthetic oxygen-evolution system studied by reconstitution experiments // *BBA*. 1985. V. 806. P. 283.  
[https://doi.org/10.1016/0005-2728\(85\)90107-0](https://doi.org/10.1016/0005-2728(85)90107-0)
21. Hutchison R.S., Steenhuis J.J., Yocum Ch.F., Razeghifard M.R., Barry B.A. Deprotonation of the 33-kDa, extrinsic, manganese-stabilizing subunit accompanies photooxidation of manganese in photosystem II // *J. Biol. Chem*. 1999. V. 274. P. 31987.
22. Zhang F., Gao J., Weng J., Tan C., Ruan K., Xu Ch., Jiang D. Structural and Functional Differentiation of Three Groups of Tyrosine Residues by Acetylation of N-Acetylimidazole in Manganese Stabilizing Protein // *Biochemistry*. 2005. V. 44. P. 719.  
<https://doi.org/10.1021/bi0483559>

23. *Seidler A.* Intermolecular and intramolecular interactions of the 33-kDa protein in photosystem II // *Eur. J. Biochem.* 1996. V. 242. P. 485.
24. *Isogai Y., Yamamoto Y., Yamamoto Y., Nishimura M.* Isolation of photosystem II reaction center complex by affinity chromatography with the peripheral 33-kDa polypeptide as ligand // *FEBS Letters.* 1987. V. 224. P. 71.
25. *Gounaris K., Chapman D.J., Barber J.* The interaction between the 33 kDa manganese-stabilising protein and the D1/D2 cytochrome b-559 complex // *FEBS Letters.* 1988. V. 234. P. 374.
26. *Lorch S., Capponi S., Pieront F., Bondar A.N.* Dynamic Carboxylate/Water Networks on the Surface of the PsbO Subunit of Photosystem II // *J. Phys. Chem. B.* 2015. V. 119. P. 12172.  
<https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.5b06594>
27. *Guerra F., Siemers M., Mielack C., Bondar A.N.* Dynamics of Long-Distance Hydrogen-Bond Networks in Photosystem II // *J. Phys. Chem. B.* 2018. V. 122. P. 4625.
28. *Shitov A.V., Pobeguts O.V., Smolova T.N., Allakhverdiev S.I., Klimov V.V.* Manganese-dependent carboanhydrase activity of photosystem II proteins // *Biochemistry (Moscow).* 2009. V. 74. P. 509.
29. *Lu Y.-K., Theg S.M., Stemler A.J.* Carbonic Anhydrase Activity of the Photosystem II OEC33 Protein from Pea // *Plant Cell Physiol.* 2005. V. 46. P. 1944.  
<https://doi.org/10.1093/pcp/pci209>
30. *Liu K., Sun J., Song Y., Liu B., Xu Y., Zhang Sh., Tian Q., Liu Y.* Superoxide, hydrogen peroxide and hydroxyl radical in D1/D2/cytochrome b-559 Photosystem II reaction center complex // *Photosynth. Res.* 2004. V. 81. P. 41.
31. *Das A.B., Nagy P., Abbott H.F., Winterbourn Ch.C., Kettle A.J.* Reactions of superoxide with the myoglobin tyrosyl radical // *Free Radical Biology and Medicine.* 2010. V. 48. P. 1540.
32. *Offenbacher A.R., Polander B.C., Barry B.A.* An Intrinsically Disordered Photosystem II Subunit, PsbO, Provides a Structural Template and a Sensor of the Hydrogen-Bonding Network in Photosynthetic Water Oxidation // *J. Biol. Chem.* 2013. V. 288. P. 29056.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M113.487561>
33. *Nagao R., Suzuki T., Okumura A., Niikura A., Iwai M., Dohmae N., Tomo T., Shen J.R., Ikeuchi M., Enami I.* Topological Analysis of the Extrinsic PsbO, PsbP and PsbQ Proteins in a Green Algal PSII Complex by Cross-Linking with a Water-Soluble Carbodiimide // *Plant Cell Physiol.* 2010. V. 51. P. 718.  
<https://doi.org/10.1093/pcp/pcq042>
34. *Leuschner C., Bricker T.M.* Interaction of the 33 kDa Extrinsic Protein with Photosystem II: Rebinding of the 33 kDa Extrinsic Protein to Photosystem II Membranes Which Contain Four, Two, or Zero Manganese per Photosystem II Reaction Center // *Biochemistry.* 1996. V. 35. P. 4551.  
<https://doi.org/10.1021/bi9522615>
35. *Semin B.K., Podkovirina T.E., Davletshina L.N., Timofeev K.N., Ivanov I.I., Rubin A.B.* The extrinsic PsbO protein modulates the oxidation/reduction rate of the exogenous Mn cation at the high-affinity Mn-binding site of Mn-depleted PSII membranes // *J. Bioenerg. Biomembr.* 2015. V. 47. P. 361.  
<https://doi.org/10.1007/s10863-015-9618-8>
36. *Odom W., Bricker T.M.* Interaction of CPa-1 with the manganese-stabilizing protein of Photosystem II: identification of domains cross-linked by 1-ethyl-3-[3-(dimethylamino) propyl] carbodiimide // *Biochemistry.* 1992. V. 31 P. 5616.
37. *Murakami R., Ifuku K., Takabayashi A., Shikanai T., Endo T., Sato F.* Functional dissection of two *Arabidopsis* PsbO proteins PsbO1 and PsbO2 // *FEBS J.* 2005. V. 272. P. 2165.
38. *Raval M.K., Ramaswamy N.K., Nair P.M.* Mechanism of Mn<sup>II</sup> oxidation by the extrinsic 33 kDa protein of photosystem II // *Plant Science.* 1994. V. 98. P. 141.
39. *Gerland L., Friedrich D., Hopf L., Donovan E.J., Wallmann A., Erdmann N., Diehl A., Bommer M., Buzar K., Ibrahim M., Schmieder P., Dobbek H., Zouni A., Bondar A.-N., Dau H., Oschkinat H.* pH-Dependent Protonation of Surface Carboxylates in PsbO Enables Local Buffering and Triggers Structural Changes // *Chembiochem.* 2020. V. 21. P. 1597.  
<https://doi.org/10.1002/cbic.201900739>
40. *Commet A., Boswell N., Yocum C.F., Popelka H.* pH Optimum of the Photosystem II H<sub>2</sub>O Oxidation Reaction: Effects of PsbO, the Manganese-Stabilizing Protein, Cl<sup>-</sup> Retention, and Deprotonation of a Component Required for O<sub>2</sub> Evolution Activity // *Biochemistry.* 2012. V. 51. P. 3808.  
<https://doi.org/10.1021/bi201678m>