# Фотосинтетический кислород: роль H2O2

По современным представлениям фотосинтетический кислород выделяется из воды. Имеется ряд соединений, аналогов H2O, взаимодействующих с водоокисляющим комплексом. Среди них особый интерес представляет пероксид водорода в связи с его возможным участием в фотосинтетическом выделении O2. Существуют предположения об H2O2 как промежуточном продукте окисления H2O и даже как об исходном субстрате-доноре электронов. У некоторых цианобактерий и водорослей выделение O2 прекращается в анаэробных условиях. Исследования роли H2O2в фотосинтетическом выделении O2 представляются перспективными.

According to current views, the photosynthetic oxygen is evolved from the water. There is a number of compounds, of the H2O analogues, interacting with the water-oxidizing complex. Among these compounds, of particular interest is hydrogen peroxide as a possible participant in photosynthetic O2 evolution. There are the assumptions of H2O2 as an intermediate in H2O oxidation and, moreover, as the starting electron donor substrate. In several cyanobacteria and algae, O2 evolution in the light is ceased under the anaerobic conditions. The elucidation of the H2O2 role looks promising for the studies on photosynthetic O2 evolution.

Фундаментальная проблема биохимии - механизм фотосинтетического выделения кислорода. Проблема не нова, возникла со времен Джозефа Пристли, открывшего в 1771 г. фотосинтетический кислород. Важность ее решения трудно переоценить: космическая роль зеленого листа по К.А.Тимирязеву заключается в фотосинтезе органических веществ и молекулярного кислорода - субстратов, обеспечивающих жизнедеятельность хемотрофных организмов. Проблема фотосинтетического кислорода имеет комплексный характер, исследования ведутся во многих лабораториях мира. В последние годы в решении проблемы наметился определенный прогресс. Наряду с фундаментальностью, проблема имеет и прикладную перспективу, в частности, ее решение позволило бы использовать принципы фотосинтетического механизма для получения из воды молекулярного водорода в качестве энергоносителя.

По современным представлениям фотосинтетический кислород выделяется из воды [1]. Фотосистема (ФС) II хлоропластов и цианобактерий функционирует как H2O:пластохинон-оксидоредуктаза [2]:

H2O → (Mn)4 → YZ → P680 → Фео → QA → QB QP → QZ (*b6f*),

где (Mn)4 - четырехъядерный Mn-кластер водоокисляющего комплекса (ВОК), YZ - остаток тирозина-161 в полипептиде D1 фотосистемы II, P680 - реакционный центр ФСII, Фео - промежуточный акцептор электронов (феофитин), QA и QB - первичный и вторичный пластохиноны, QP - мембранный фонд пластохинона, QZ - участок связывания пластохинона в *b6f*-цитохромном комплексе.

Окисление H2O включает четыре одноэлектронные стадии, приводящие к последовательному накоплению окислительных эквивалентов в Mn-кластере. Соответственно, Mn-кластер может находиться в пяти различных окислительно-восстановительных состояниях, обозначаемых символами S0-S4. Состояния S0 и S1стабильны в темноте, S4 превращается в S0 сопряженно с выделением O2, состояния S2 и S3 не устойчивы и релаксируют в темноте в состояние S1 за десятки секунд. В темноте соотношение S1 : S0 составляет 3-4, поэтому в условиях импульсного освещения, когда каждая световая вспышка вызывает один оборот P680, максимальный выход O2 из H2O наблюдается в ответ на третий импульс; на первый импульс O2 не выделяется.

Данные структурных исследований позволяют предположить, что (Mn)4 представляет собой димер из двух биядерных центров. Это согласуется с данными о функциональной неоднородности четырех Mn-центров (см. [3] и цитированную там литературу). Одна из (Mn)2-групп, (Mn-Mn)ВОК, образует каталитический центр ВОК; другая, (Mn-Mn)C, по-видимому, служит регулятором функциональной активности (Mn-Mn)ВОК. Существует ряд соединений, аналогов H2O, взаимодействующих с ВОК. Так, окисление NH2OH и NH2NH2 ведет к образованию сверхвосстановленных состояний (Mn)4-кластера - состояний S-1 и S-2 [3]: протекают реакции S1 → S-1 и S2 → S-2, которые в рамках представлений о биядерных (Mn)2-группах могут соответствовать переходам:

и

Особый интерес среди аналогов H2O представляет пероксид водорода. В присутствии H2O2 хлоропласты выделяют O2 в ответ на первый световой импульс [4]. Этот результат подтвержден в опытах с H218O2 [5]. В темноадаптированных тилакоидах хлоропластов H2O2 вызывает переход S1 → S-1 [4, 5]. При этом устанавливается соотношение S0 : S-1  : S1, близкое к 0 : 6 : 4 [5]. Состояние S-1 стабильно и не релаксирует, по меньшей мере, в течение 15 мин [5]. Одиночный световой импульс вызывает переход S-1/S1 → S0/S2, который инициирует темновую реакцию окисления H2O2 с образованием O2 [4,5]. Как продемонстрировано в опытах с H218O2, весь O2 выделяется из H2O2 [5], в расчете на 1 P680 после одиночной вспышки света выделяется более 20 молекул O2. Эта реакция, подобная каталазной реакции, предположительно обусловлена восстановлением S2 до S0 посредством H2O2 (E0' для O2/H2O2 равен 0,295 В) и последующим H2O2-зависимым окислением S0 до S2 (E0' для H2O2/H2O равен 1,42 В). Реакции S-состояний, вызываемые H2O2, иллюстрирует схема (по [5]).

Переходы S2 → S1 и S0 S-1 приводят к постепенному затуханию темнового выделения O2 из H2O.

Имеются данные о том, что выделение O2 из H2O2 в результате циклического перехода S2 → S0 → S2 возможно без предварительного воздействия одиночным световым импульсом [6-8]. Процесс зависит от (Mn)4, Ca2+ и Cl- [6]. Эти данные, однако, подвергнуты критике [9]. В частности, комплексы ФСII, лишенные субъединиц ВОК с молекулярной массой 17 и 24 кДа ( на которых проводились опыты [6-8]), по данным работы [10] при воздействии H2O2 теряют Mn, а по данным работы [8] полностью сохраняют его и при этом характеризуются отсутствием шестиполосного сигнала ЭПР от Mn2+, находящегося в водном окружении. Утверждается [9], что такой сигнал в условиях комнатной температуры, в которых проводились измерения [8], должен регистрироваться и в образцах с нативным Mn-кластером ВОК. Тилакоидные мембраны, обедненные Cl-, не способны к фотоокислению H2O, но выделяют O2 из H2O2 на свету [11]. Опыты с антибиотиком A23187 (осуществляющим трансмембранный обмен двухвалентных катионов на 2H+) и данные о действии добавленного Mn2+ склонили авторов работы [11] к предположению о том, что фотоокисление H2O2 в таких мембранах катализируется свободным или лабильно связанным Mn, возникающим в результате H2O2-зависимой деструкции (Mn)4, входящего в состав ВОК. Добавленный Mn2+ поддерживает окисление H2O2 в тилакоидных мембранах, обогащенных ФСII и предварительно лишенных Mn [12].

Таким образом, к настоящему времени нет ясности по вопросу, нужен ли для выделения O2 из H2O2 интактный ВОК. Или этот процесс протекает и после деструкции ВОК? В этом случае пути окисления H2O и H2O2 расходятся, и тогда изучение разложения H2O2 в качестве подхода для познания механизма выделения O2 из H2O теряет смысл.

Однако имеются данные, полученные с применением другого подхода. В определенных условиях электрон-донорная ветвь ФСII может генерировать H2O2. Образование H2O2 на свету вызывают ADRY-реагенты (ADRY - от английского "Acceleration of Deactivation Reactions of the Water-Oxidizing Complex Y", см. [2] в качестве обзора) [13] - соединения, которые, окисляясь, ускоряют дезактивацию S2- и S3-состояний с образованием S1. H2O2 образуется в вывернутых тилакоидных мембранах, если они лишены 16- и 23 кДа-полипептидов ВОК [14]. Процесс зависит от добавленного Mn2+ и подавляется ЭДТА. Освещение мембран, обогащенных ФСII в результате обработки детергентом, тоже приводит к образованию H2O2 [15, 16], как предполагают авторы, в электрон-донорной ветви ФСII.

H2O2, образованный в электрон-донорной ветви ФСII, высвобождается лишь при кислотной обработке мембран - при снижении pH до 1,4 [15]. Связанный H2O2 образуется на первую вспышку света, на последующие вспышки наблюдаются осцилляции с периодом в два такта: на нечетные вспышки H2O2 образуется, а на четные - исчезает. Выход связанного H2O2 составляет 0,35 моль на 1 моль P680. Связанный H2O2 образуется и в мембранах, лишенных Mn, но без осцилляций на последовательные вспышки света [15].

Условием образования H2O2 по данным работы [16] является помещение мембран в гипотоническую среду с низкой концентрацией сахарозы. Если в качестве акцептора электронов в реакции Хилла использовать 2,6-дихлорфенолиндофенол (ДФИФ), то количество фотовосстановленного ДФИФ в расчете на электронные эквиваленты более чем в 1,5 раза превышает количество выделенного O2. Разница стирается при добавлении каталазы [16]. Это свидетельствует о том, что значительная доля электронного транспорта через ФСII имеет результатом не выделение O2, а образование H2O2 [16]. Предлагаются два возможных варианта объяснения полученных результатов [16]: образование H2O2 как промежуточного продукта на пути окисления H2O до O2 или как продукта, возникающего в результате замыкания цикла S-состояний (S2- или S3-состояния Mn-кластера релаксируют соответственно в S0 или S1 с высвобождением H2O2).

Таким образом, и этот подход не дает однозначных результатов относительно роли H2O2 в фотоокислении H2O. Более того, при одноэлектронном восстановлении O2 компонентами электрон-акцепторных ветвей ФСII и ФСI образуется O2-. (см. [17] и цитированную там литературу). В изолированных хроматофорах пурпурных бактерий окисляется вторичный хинон, наиболее вероятно, в форме семихинона [18, 19]. При обработке хроматофоров детергентами с O2 взаимодействует бактериофеофитин [20]. В модельных системах кислородом окисляются фотовозбужденные хлорофилл *а* и бактериохлорофилл *а* [21, 22]. Комплексы ФСII обладают высокой активностью супероксиддисмутазы [17], катализирующей реакцию:

2O2-. + 2H+ → H2O2 + O2.

Применение еще одного подхода, "эволюционного", к проблеме фотосинтетического кислорода представляется перспективным. Эволюционно творцами оксигенного фотосинтеза стали цианобактерии. Многие из них образуют на свету H2O2 [23]. Перенос электронов на O2 с последующим образованием H2O2 у цианобактерии *Microcoleus chtonoplastes* достигает 40% общего потока электронов через ФСII [24]. Исследованная цианобактерия имеет высокую активность супероксиддисмутазы и не содержит каталазы [24].

В условиях импульсного освещения изолированные тилакоиды *Oscillatoria chalybea* выделяют O2 в ответ на первую световую вспышку (см. [25] и цитированную там литературу). Такие же данные получены с представителями *Synechocystis* и *Synechococcus*. Масс-спектрометрический анализ показал, что освещение мембран *O. chalybea* в присутствии H218O2 или 18O2 в газовой фазе приводит к выделению 18O2. Сделан вывод о том, что 18O2, добавленный в газовую фазу, растворяется в водной фазе, поглощается мембранами и превращается в компонент, который окисляется при освещении с выделением 18O2. Данные изотопного распределения (16O2, 16O18O, 18O2) показывают, что кислород выделяется не из H218O, поскольку сигнал 16O18O, который неизбежно должен возникать при окислении воды, невелик. Следовательно, 18O2 выделяется из H218O2, образующегося в результате темнового поглощения 18O2 из газовой фазы [25]. Фотоокисление воды у *O. chalybea* тоже происходит, но доля H2O в светозависимом выделении O2 значительно ниже, чем доля H2O2. В анаэробных условиях выход O2 на свету существенно снижается, при этом подавляется выделение O2 из H2O2, но не из H2O [25]. Анаэробиоз ингибирует также фотовыделение O2 зеленой водорослью *Ulva sp.* [26].

Таким образом, для фотосинтетического выделения O2 указанными организмами требуется, чтобы в среде содержался O2, наиболее вероятно, как субстрат для образования H2O2. Предполагается, что H2O2 является эволюционным предшественником H2O в качестве донора электронов для ФСII [25].

Более того, выдвинуто предположение [27], что в ходе современного фотосинтеза O2 выделяется не из H2O, а из H2O2 экзогенного и эндогенного (внутриклеточного) происхождения.

Процессы образования H2O2 в атмосфере и природных водоемах, а также в клетках микроорганизмов подробно рассмотрены в обзоре [28]. Отметим лишь, что согласно расчетам [28] на каждый квадратный метр поверхности суши и океанов за год с осадками выпадает ~ 200 г H2O2 [28], до 15% O2, потребляемого организмом животного, превращается в H2O2 [29]. Генераторами H2O2 в фотосинтезирующей клетке являются тилакоидные мембраны, митохондрии, пероксисомы, эндоплазматический ретикулум. Концентрация H2O2 в водоемах в среднем составляет 10-6 М [28]. Для использования в фотосинтезе маловато. Поэтому предполагаются механизмы концентрирования H2O2 в клетке, например, в результате транспирации [27]. Напомним, что концентрация CO2 в воздухе тоже невелика - 0,03%.

Если H2O2 принять в качестве эволюционного предшественника H2O как донора электронов при фотосинтезе, то для образования H2O2 был необходим O2. Мог ли O2 появиться в добиогенный период развития Земли? Кислород современной земной атмосферы на 2,3% тяжелее кислорода, образующегося фотосинтетически [30]. Следовательно, помимо фотосинтеза должен быть другой источник O2, поставляющий его в атмосферу. "...свободный кислород в газовой фазе появился на Земле в глубокой древности, т.е. в раннем докембрии, в результате дегазации базальтовой магмы, подобно тому как появились в атмосфере и другие газы. Более того, он продолжает поступать из земных недр до настоящего времени. Магма является тем первым мощным источником кислорода в природе, который определяет количество и качество его в атмосфере совместно с появившимся несколько позднее кислородом фотосинтетическим" ([30], стр. 10). Кислород современной атмосферы на 30% имеет фотосинтетическое и на 70% геологическое (из земных недр) происхождение [30]. По данным минералогии, как было отмечено В.Н.Вернадским [31], в пределах научно изученных геологических периодов состав воздуха не менялся.

Рассмотренные данные показывают, что H2O2, возможно, играет важную роль в системе фотосинтетического выделения O2, однако эти данные не поддаются однозначной интерпретации. H2O2 - промежуточный продукт окисления H2O или исходный субстрат-донор электронов? Пока нельзя даже ответить на вопрос: H2O2 - это хорошо или плохо для фотосинтеза? Имеются данные о пагубном действии H2O2. H2O2, образующийся как в электрон-донорной, так и в электрон-акцепторной ветви ФСII, вызывает фотоингибирование ВОК [32].

Таким образом, представление о воде как доноре электронов и источнике кислорода при фотосинтезе не является однозначным. В последние годы появились данные об участии H2O2 в фотосинтетическом выделении O2. Исследования в этой области представляются перспективными.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грантом 94-04-12227-а).

## Список литературы

1. Самуилов В.Д. (1993) *Биохимия*, 58,1481-1485.
2. Самуилов В.Д., Киташов А.В. (1996) *Биохимия*, 61, 404-411.
3. Messinger, J., and Renger, G. (1993) *Biochemistry*, 32, 9379-9386.
4. Velthuys, B., and Kok, B. (1978) *Biochim. Biophys. Acta*, 502, 211-221.
5. Mano, J., Takahashi, M., and Asada, K. (1987) *Biochemistry*, 26, 2495-2501.
6. Frasch, W.D., and Mei, R. (1987) *Biochim. Biophys. Acta*, 891, 8-14.
7. Frasch, W.D., and Mei, R. (1987) *Biochemistry*, 26, 7321- 7325.
8. Frasch, W.D., Mei, R., and Sanders, M.A. (1988) *Biochemistry*, 27, 3715-3719.
9. Debus, R.J. (1992) *Biochim. Biophys. Acta*, 1102, 269-352.
10. Ghanotakis, D.F., Topper, J.N., and Yocum, C.F. (1984) *Biochim. Biophys. Acta*, 767, 524-531.
11. Sandusky, P.O., and Yocum, C.F. (1988) *Biochim. Biophys. Acta*, 936, 149-156.
12. Klimov, V.V., Allakhverdiev, S.I., Shuvalov, V.A., and Krasnovsky, A.A. (1982) *FEBS Lett*., 148, 307-312.
13. Sayre, R.T., and Homann, P.H. (1979) *Arch. Biochem. Biophys*., 196, 525-533.
14. Schroder, W.P., and Akerlund, H.-E. (1986) *Biochim. Biophys. Acta*, 848, 359-363.
15. Ананьев Г.М., Климов В.В. (1988) *Докл. АН СССР*, 298, 1007-1011.
16. Wydrzynski, T., Angstrom, J., and Vanngard, T. (1989) *Biochim. Biophys. Acta*, 973, 23-28.
17. Ananyev, G., Renger, G., Wacker, H., and Klimov, V.V. (1994) *Photosynth. Res*., 41, 327-338.
18. Remennikov, V.G., and Samuilov, V.D. (1979) *Biochim. Biophys. Acta*, 546, 220-235.
19. Remennikov, V.G., and Samuilov, V.D. (1979) *Arch. Microbiol*., 123, 65-71.
20. Ременников В.Г., Самуилов В.Д. (1980) *Докл. АН СССР*, 252, 491-494.
21. Abdourashitova, F.D., Barsky, E.L., Gusev, M.V., Il'ina, M.D., Kotova, E.A., and Samuilov, V.D. (1984) *Photobiochem. Photobiophys*., 8, 133-142.
22. Барский Е.Л., Камилова Ф.Д., Ременников В.Г., Самуи-лов В.Д. (1986) *Биофизика* , 31, 789-792.
23. Stevens, S.E., Patterson, C.O.P., and Myers, J. (1973) *J. Phycol*., 9, 427-435.
24. Дубинин А.В., Застрижная О.М., Гусев М.В. (1992) *Микробиология*, 61, 384-389.
25. Bader, K.P. (1994) *Biochim. Biophys. Acta*, 1188, 213-219.
26. Popovic, R., Swenson, S.I., Colbow, K., Vidaver, W.E., and Bruce, D. (1987) *Photosynthetica*, 21, 165-174.
27. Комиссаров Г.Г. (1995) *Хим. физика* , 14, 20-28.
28. Штамм Е.В., Пурмаль А.П., Скурлатов Ю.И. (1991) *Успехи химии*, 60, 2373-2411.
29. Oshino, N., Jamieson, D., Sugano, T., and Chance, B. (1975) *Biochem J*., 146, 67-73.
30. Бгатов В.И. (1985) *История кислорода земной атмо-сферы*. Недра, Москва.
31. Вернадский В.Н. (1955) *Избр. соч*., Т. 2, Изд-во АН СССР, Москва, с. 448.
32. Bradley, R.L., Long, K.M., and Frash, W.D. (1991) *FEBS Lett*., 286, 209-213.