

## СТРУКТУРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ФОТОСИСТЕМЫ II ЦИАНОБАКТЕРИЙ

©2013 г. А. Г. ГАБДУЛХАКОВ, М. В. ДОНЦОВА

*Институт белка РАН, Пущино, Московская область*

I. Введение. II. Локализация и состав фотосистемы II. III. Кислород-выделяющий комплекс. IV. Расчеты продукт/субстратных каналов в фотосистеме II. V. Пластохиноны. VI. Мономерная форма ФС II. VII. Фемтосекундная дифракция микрокристаллов ФС II. VIII. Заключение.

### I. ВВЕДЕНИЕ

Солнце – один из наиболее крупных источников энергии на нашей планете. Сохранение подобной энергии без потерь представляет собой жизненно важное направление исследований в области энергетических ресурсов. Биологические системы, способные преобразовывать энергию солнца с максимальной эффективностью, появились порядка двух – трех миллиардов лет назад, и благодаря их работе образовались запасы нефти, угля и газа. Последовательность реакций, в результате которых энергия света сохраняется в виде макроэргических соединений, назвали фотосинтезом. До сих пор механизм этого процесса остается слабо изученным. Существует огромное разнообразие ферментов фотосинтеза от простейших фотореакционных центров, располагающихся в мембранах фотосинтезирующих бактерий, до сложных мультисубъединичных комплексов, называемых фотосистемами и располагающихся в тилакоидах растений, водорослей и цианобактерий.

---

*Принятые сокращения:* ФС II – Фотосистема II; КВК – кислород-выделяющий комплекс; PQ – пластохинон; PC – реакционный центр; РСА – рентгено-структурный анализ; МАЛДИ – матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация; МГДГ – моногалактасил диацилглицерин; ДГДГ – дигалактозил диацилглицерин; СХДГ – сульфохинозил диацилглицерин; ФГ – фосфатидилглицерин.

*Адрес для корреспонденции:* azat@vega.protres.ru

Работа выполнена при поддержке программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и гранта РФФИ № 13-04-01148а.

На первом этапе фотосинтетического процесса происходит абсорбция энергии света. Эта энергия поглощается светособирающими пигментами и передается пигментам ловушкам в реакционный центр. В РЦ возникает первичное разделение зарядов, в результате которого энергия света превращается в энергию химической связи. В процессе поглощения света пигменты теряют электроны и для восстановления им необходим поставщик электронов. В кислородном фотосинтезе основной поставщик электронов – молекула воды. Фермент, осуществляющий расщепление воды на протоны, электроны и молекулярный кислород, называется фотосистемой II.

Настоящий обзор посвящен структурным исследованиям фотосистемы II цианобактерий. Именно благодаря реакции воспроизводимой этим фотокомплексом появились запасы кислорода в биосфере Земли.

## II. ЛОКАЛИЗАЦИЯ И СОСТАВ ФОТОСИСТЕМЫ II

Фотосистема II представляет собой ансамбль белков, липидов и пигментов. Она располагается в толще тилакоидной мембраны. У растений и водорослей эта мембрана является частью специализированных органелл – хлоропластов. У цианобактерий все находится непосредственно в цитоплазматических мембранных выпячиваниях.

В течение нескольких десятков лет различные группы исследователей пытались определить пространственную структуру компонентов, составляющих комплекс фотосистемы II. В итоге методом рентгеноструктурного анализа в 2001 г. А. Зоуни с коллегами удалось впервые получить пространственную структуру ФС II из цианобактерии *Synechococcus elongatus* с разрешением 3.8Å [1]. Фермент был в активной форме, т.е. ФС II в кристаллической форме расщепляла воду под воздействием света [2]. Далее в течение нескольких лет качество структуры фотосистемы II и предел ее разрешения постепенно повышались [3–6]. И в 2009 году это привело к определению модели ФС II с разрешением 2.9Å [7]. В результате, в пространственной организации фотосистемы II из *Thermosynechococcus elongatus* уже можно было различить все двадцать белковых субъединиц, тридцать пять молекул хлорофиллов, двенадцать молекул каротиноидов и двадцать пять молекул встроенных липидов. Это наиболее полная модель фотосистемы II по своему мультисубъединичному составу, на данный момент. К сожалению, каталитический центр фотосинтетического окисления воды, представляющий собой уникальный комплекс металлов, был трудно

различим при таком разрешении. Поэтому эксперименты по улучшению разрешения модели фотосистемы II продолжались и к настоящему моменту структура ФС II из термофильной цианобактерии *Thermosynechococcus vulcanus* определена с разрешением 1.9Å [8]. При таком разрешении удалось определить положение отдельных атомов кластера, осуществляющего окисление воды до кислорода, протонов и электронов.

Все представленные модели фотосистемы II были получены с кристаллов гомодимерных ФС II, изолированных из термофильных цианобактерий. Попытки получения структуры этого комплекса из других организмов до сих пор не увенчались успехом. Были сообщения о полученных данных с кристаллов ФС II из красных водорослей, но эта структура пока не опубликована [9].

В состав одного мономера фотосистемы II входит двадцать различных белковых субъединиц [7]. Из них семнадцать белков расположены внутри мембраны, а три находятся со стороны люмена (рис. 1). Пигменты мономера представлены тридцатью пятью молекулами хлорофилла *a* (Chl*a*), двумя молекулами феофитина *a* (Pheo*a*), двумя молекулами гема (входящими в состав цитохромов b559 и c550), двенадцатью молекулами β-каротина и тремя молекулами пластохинона PQ (Q<sub>A</sub>, Q<sub>B</sub>, и Q<sub>C</sub>). Кроме этого в состав мономера фотосистемы II также входят двадцать пять молекул встроенных липидов, ионы кальция, марганца, хлора, железа и бикарбоната.

Каркас мономера фотосистемы II образуют две большие субъединицы PsbA и PsbD, традиционно известные как белки D1 и D2, соответственно. Эти субъединицы гомологичны [10] и имеют схожие пространственные структуры. Они представляют собой α/β белки, состоящие в основном из α-спиралей. Центральные пять трансмембранных α-спиралей в каждой субъединице организованы в два полукруга и соединены между собой «handshake» мотивом, связанным локальной осью второго порядка. Именно субъединицы D1 и D2 формируют основную мембранную часть фотосистемы II и образуют фотосинтетический реакционный центр. Эти белки взаимодействуют со всеми пигментами электрон-транспортной цепи, которая представлена двумя симметричными ветвями переносчиков электронов, связанными псевдосимметрией второго порядка. Одну ветвь электрон-транспортной цепи составляет специальная пара хлорофиллов P<sub>D1</sub>, состоящая из двух молекул Chl*a*, а также Chl<sub>D1</sub>, Pheo<sub>D1</sub> и Q<sub>A</sub>, а другую – их симметричные аналоги, которыми являются P<sub>D2</sub>, Chl<sub>D2</sub>, Pheo<sub>D2</sub> и Q<sub>B</sub>. Между молекулами пластохинонов Q<sub>A</sub> и Q<sub>B</sub> находится атом негемового железа. С каждым из белков

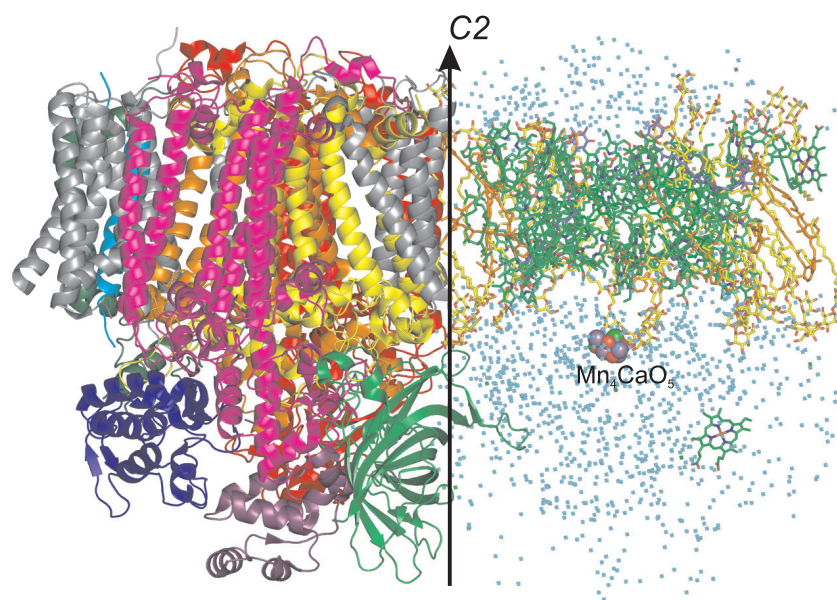


Рис. 1. Общий вид пространственной структуры димера фотосистемы II из *Thermosynechococcus elongates* с разрешением 1.9 Å. Стрелкой указана некристаллографическая ось второго порядка. Слева мономер ФС II представлен белковой частью (цветом окрашены белки: D1 – желтым, CP47 – красным, CP43 – пурпурным, D2 – оранжевым, PsbE – темно-зеленым, PsbF – голубым, PsbO – зеленым, PsbU – фиолетовым, PsbV – синим, остальные субъединицы окрашены серым). Справа мономер ФС II представлен небелковой частью (хлорофиллы *a*, феофитины и молекулы гема окрашены зеленым, каротиноиды – оранжевым, пластохиноны – фиолетовым, липиды – желтым, молекулы воды – голубым).

и с D1, и с D2 взаимодействует по одной молекуле каротиноида. Вся эта совокупность субъединиц и пигментов окружена двумя другими крупными белками PsbB и PsbC, которые составляют ядро светопоглощающей системы, и еще называются антенными комплексами CP47 и CP43, соответственно. Они связаны с большинством молекул хлорофилла *a*, за исключением молекул Chl*a* относящихся к реакционному центру. В частности белок CP47 взаимодействует с шестнадцатью молекулами Chl*a*, а CP43 – с тринадцатью. Субъединица CP47 располагается рядом с поверхностью взаимодействия мономеров ФС II и белком D2, тогда как CP43 располагается на периферии комплекса в непосредственной близости к субъединице D1. Кроме их антенной функции, CP47 и CP43 играют важную роль в стабилизации всего ансамбля фото-

системы II, а также кислород-выделяющего центра. Между собой антенные белки гомологичны [10] и имеют схожие пространственные структуры. Они состоят из  $\alpha$ -спиралей и  $\beta$ -тяжей. Оба белка имеют по шесть  $\alpha$ -спиралей пронизывающих мембрану. Со стороны люмена они отличаются количеством и размерами  $\beta$ -тяжей. В обеих субъединицах имеется большое количество неструктурированных петель со стороны люмена. Эти петли, выходящие за пределы мембраны в просвет, участвуют во взаимодействиях с наружными белками. Со стороны цитоплазмы белки CP47 и CP43 также имеют неструктурированные участки.

Четыре субъединицы D1, D2, CP47 и CP43 составляют основу всего мономера фотосистемы II. Остальные шестнадцать белковых субъединиц окружают этот комплекс и стабилизируют его целостность. Одиннадцать из них представляют собой низкомолекулярные белки, образованные всего одной трансмембранной  $\alpha$ -спиралью. Это субъединицы: PsbF, PsbH, PsbI, PsbJ, PsbK, PsbL, PsbM, PsbT, PsbX, PsbY и Ycf12. Субъединица PsbZ состоит из двух трансмембранных  $\alpha$ -спиралей. Субъединица PsbE состоит из трех  $\alpha$ -спиралей, из которых одна  $\alpha$ -спираль проходит сквозь мембрану, а две других располагаются с люменальной стороны фотосинтетического комплекса. Вместе с субъединицей PsbF белок PsbE связывает гем-группу, представляя собой  $\alpha$  и  $\beta$  субъединицы цитохрома b559. Все эти белки располагаются внутри мембраны.

Остальные субъединицы находятся с люменальной стороны комплекса, и их называют наружными. К ним относится белок PsbU, он образован шестью  $\alpha$ -спиралями и двумя короткими  $\beta$ -тяжами. Белок PsbV, связанный с гем-группой и состоящий из пяти  $\alpha$ -спиралей и четырех  $\beta$ -тяжей, образует цитохром c550. На люменальной стороне фотосистемы II так же располагается белок PsbO, это единственная субъединица фотокомплекса полностью состоящая из восьми  $\beta$ -тяжей, образующих длинный  $\beta$ -бочонок.

Кроме белков и пигментов в каждом мультисубъединичном мономере фотосистемы II обнаружены молекулы липидов, среди них одиннадцать молекул моногалактасил диацилглицерина (МГДГ), семь молекул дигалактозил диасилглицерина (ДГДГ), пять молекул сульфоиновозил диацилглицерина (СХДГ) и две молекулы фосфатидилглицерина (ФГ). Такая композиция липидов хорошо соответствует среднестатистическому липидному составу тилакоидной мембраны, которая обычно состоит на ~45% из МГДГ, ~25% – ДГДГ, 15–25% – СХДГ и 5–15% ФГ [11]. В структуре ФС II молекулы липидов распределены ассиметрично. Негативно заряженные головки ФГ и СХДГ

располагаются исключительно на цитоплазматической стороне, незаряженные ДГДГ на люменальной стороне, а головки МГДГ располагаются на обеих сторонах. Каждая липидная головка образует полярные контакты, т.е. водородные связи или солевые мостики, по крайней мере, с двумя различными белковыми субъединицами. Кроме того, с молекулами липидов взаимодействует большинство молекул каротиноидов, за исключением двух связанных с белками D1 и D2.

Мультисубъединичные мономеры фотосистемы II связаны между собой некристаллографической осью симметрии  $C_2$ . В области взаимодействия они имеют некоторые белок-белковые контакты, но в основном поверхность между двумя мономерами заполняют липиды. Из белковых субъединиц лишь три низкомолекулярных белка PsbL, PsbM и PsbT формируют трех спиральный узел на поверхности взаимодействия мономеров, а две симметричные субъединицы PsbM и PsbM' образуют семичленный мотив алифатических боковых цепей на подобие лейциновой молнии. Предполагается, что именно липиды играют важную роль в формировании димера фотосистемы II [12].

В процессе своей работы полный комплекс ФС II периодически диссоциирует и ассоциирует [13, 14], это является необходимым условием для обеспечения замены светоповрежденных в результате фотоокисления воды частей фотосистемы. Для того чтобы обойти проблему разборки и сборки всего фотокомплекса, в ФС II существуют сложенные восстановительные мероприятия, которые избирательно заменяют субъединицу D1. Именно этот белок наиболее часто повреждается, так как участвует в электрон-транспортной цепи [15]. Внутри каждого мономера ФС II липиды образуют некое подобие пояса, который окружает субъединицы D1 и D2, и частично отделяет РЦ от других внутримембранных белков. Эти липиды обеспечивают удобную среду, которая может иметь значение для быстрого круговорота белка D1 во время репарации ФС II.

### III. КИСЛОРОД-ВЫДЕЛЯЮЩИЙ КОМПЛЕКС

Каталитическим центром окисления воды является марганцевый кластер, который также называют кислород-выделяющим комплексом. Этот кластер находится в люменальной части ФС II и проходит через циклы Si-состояния ( $I = 0-4$ ) [16, 17] [для обзора см. [18]].

Как было описано ранее, структура ФС II из двух тесно связанных термофильных цианобактерий *Thermosynechococcus elongatus* [1, 4, 6, 7] и *T. vulcanus* [3, 19] была решена в диапазоне разрешения от 2.9 Å до 3.8 Å разными научными группами. Эти структурные исследования



позволили определить местоположение реакционного центра, однако, разрешение не было достаточно высоким, чтобы позволить определить его точную структуру. Предполагалось, что кластер состоит из четырех атомов марганца, одного атома кальция, некоторого количества атомов кислорода, а также, возможно, и молекул воды, являющихся субстратом реакции, осуществляемой в  $Mn_4CaO_x$ -кластере. Во время сбора дифракционных данных кластер разрушался под воздействием рентгеновского излучения [20, 21]. В результате наблюдались некоторые различия в геометрическом расположении атомов, а также и в модели лигандирования кластера [1, 3, 4, 6, 7, 19, 22–24].

Полученная недавно модель ФС II с разрешением 1.9 Å [8] позволила впервые подробно описать устройство марганцевого кластера (рис. 2А). В картах электронной плотности, представленных ранее, пять ионов металлов из  $Mn_4CaO_x$ -кластера не были разделены и представляли собой электронную плотность шарообразной формы [1]. На карте электронной плотности модели ФС II с разрешением 1.9 Å позиции отдельных ионов металла четко разделены и позволяют однозначно идентифицировать каждый из атомов, входящих в состав кластера [8]. Распознать положение атомов кальция и марганца при таком разрешении оказалось проще, так как количество электронов у атома кальция меньше, чем у атома марганца. На основании положения пяти ионов металлов, были описаны расстояния между каждой парой атомов марганца и между атомами марганца и кальция (рис. 2А, табл. 1) [8].

Ранее было высказано предположение о существовании одиночных и двойных  $\mu$ -оксо-мостиков, связывающих ионы металлов в  $Mn_4CaO_x$ -кластере кислород-выделяющего комплекса. В структуре ФС II с разрешением 3.5 Å четыре атома кислорода были предварительно вписаны в  $Mn_4CaO_x$ -кластер [4], в большей степени основываясь на предположении, что ионы металла должны связывать кислород. Достоверность позиций этих атомов вызывала сомнение, так как при таком пределе разрешения идентифицировать атомы кислорода в карте электронной плотности было практически невозможно. В структуре фотосистемы II с разрешением 2.9 Å атомы кислорода вообще не помещены в металлический кластер [7]. Впервые наиболее четко пять атомов кислорода для связывания пяти ионов металлов были определены в структуре ФС II с разрешением 1.9 Å.

Общая модель  $Mn_4CaO_5$ -кластера по форме напоминает искаженный стул с сиденьем, так называемым кубаном, сформированным тремя атомами марганца, четырьмя атомами кислорода и атомом кальция, а спинка стула образована отстоящими атомом марганца и

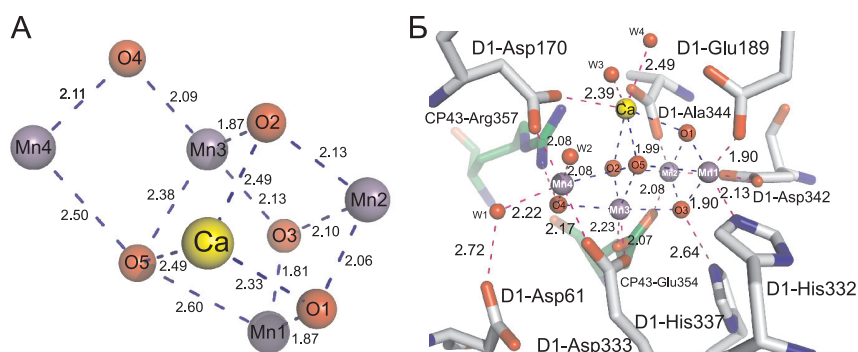


Рис. 2. А. Структура  $Mn_4CaO_5$ -кластера (атомы марганца окрашены фиолетовым, кальция – желтым, кислорода – красным);

Б. Структура лигандов  $Mn_4CaO_5$ -кластера (аминокислотные остатки, принадлежащие субъединице D1, окрашены серым цветом, принадлежащие субъединице CP43 – зеленым, молекулы воды окрашены красным).

Таблица 1.

**Внутренние и внешние контакты  $Mn_4CaO_5$ -кластера**

	Mn1	Mn2	Mn3	Mn4	Ca1
Mn1	–	2.84 (2.76)*	3.29 (3.30)	5.00 (4.95)	3.51 (3.46)
Mn2		-	2.89 (2.91)	5.44 (5.37)	3.36 (3.29)
Mn3			-	2.97 (2.91)	3.41 (3.44)
Mn4				-	3.79 (3.80)
Ca					-
O1	1.87 (1.79)	2.06 (2.03)			2.33 (2.40)
O2		2.13 (2.06)	1.87 (1.94)		2.49 (2.46)
O3	1.81 (1.83)	2.10 (2.13)	2.13 (2.02)		
O4			2.09 (2.07)	2.11 (2.08)	
O5	2.60 (2.60)		2.38 (2.40)	2.50 (2.47)	2.49 (2.79)
D1-Asp170				2.08 (2.03)	2.44 (2.37)
W1				2.22 (2.13)	
W2				2.08 (2.16)	
W3					2.39 (2.41)
W4					2.49 (2.38)
D1-Glu189	1.90 (1.79)				
D1-His332	2.13 (2.19)				
D1-Glu333			2.07 (1.98)	2.17 (2.13)	
D1-Asp342	2.26 (2.26)	2.15 (2.13)			
D1-Ala344		1.99 (1.88)			2.54 (2.46)
CP43-Glu354		2.08 (2.16)	2.23 (2.21)		

Размеры контактов указаны в ангстремах.

\* В скобках указаны дистанции во втором мономере димерной формы ФС II.



атомом кислорода. Искажение в форме стула вызвано различиями в длинах связи между атомами марганца и кислорода, и кальция с кислородом. В то время как большинство расстояний между атомами Mn–O находятся в пределах 1.9–2.1 Å, расстояния между тремя атомами марганца (Mn1, Mn3, Mn4) и одним атомом кислорода (O5) находятся в диапазоне 2.4–2.6 Å (см. табл. 1).

В дополнение к пяти атомам кислорода, были идентифицированы четыре молекулы воды (W), связанные с  $Mn_4CaO_5$ -кластером [8]. Две из них связаны с атомом Mn4 (W1, W2), в то время как две другие связаны с атомом Ca (W3, W4) (рис. 2Б). Расстояния между двумя молекулами воды и атомом Mn4 составляют 2.1–2.2 Å, а дистанции между атомом кальция и молекулами воды 2.4–2.5 Å. Никаких других молекул воды, связанных с тремя другим атомами марганца, установлено не было. Поэтому предполагается что, по крайней мере, одна из этих четырех молекул воды служит субстратом для окисления. Среди четырех молекул воды, связанных с  $Mn_4CaO_5$ -кластером, молекула W4 обладает водородной связью непосредственно с тирозином  $Y_z$  (D1–Tyr161) – аминокислотным остатком, являющимся посредником переноса электронов между реакционным центром ФС II и  $Mn_4CaO_5$ -кластером [8]. Молекулы воды W1–W3 образуют водородные связи с  $Y_z$  косвенно, через другие три молекулы воды W5–W7. Примечательно, что расстояние между W7 и  $Y_z$  составляет 2.6 Å, предполагается, что это сильная водородная связь. Кроме того  $Y_z$  взаимодействует с D1–His190 с короткой водородной связью в 2.5 Å. В дальнейшем сеть водородных связей распространяется на D1–Asn298 и далее в люменальную водную фракцию через несколько молекул воды и несколько гидрофильных или заряженных аминокислотных остатков [8]. Это наводит на мысль о наличии протон-связанного переноса электрона через  $Y_z$  в соответствии с множеством предыдущих сообщений о возможном существовании этого пути [25–29].

Важной особенностью  $Mn_4CaO_5$ -структуры является заметно большее расстояние между атомом O5 и ионами металлов по сравнению с другими атомами кислорода, располагающимися внутри кислород-выделяющего центра. Это свидетельствует о слабой связи с атомом O5 внутри кластера, что предполагает более высокую реакционную способность этого атома кислорода. Интересно, что две молекулы воды W2 и W3, связанные с атомами Mn4 и Ca соответственно, находятся в пределах водородных связей с атомом O5 (рис. 2Б). Эти результаты убедительно свидетельствуют о том, что два из трех атомов кислорода: W2, W3 и O5 – являются субстратами для образования O–O связи в ходе реакции окисления воды [30].

ЛИГАНДИРОВАНИЕ  $Mn_4CaO_5$ -КЛАСТЕРА

Большинство из аминокислотных остатков, называемых лигандами и взаимодействующих с  $Mn_4CaO_5$ -кластером, было описано в работах нескольких авторов [3, 4, 6, 7]. Однако, в связи с ограничениями в разрешении пространственных структур ФС II, а также с возможными повреждениями молекул от рентгеновского излучения существовала двусмысленность в отношении достоверности положения и состава лигандов металлического кластера. Длины связей между ионами металлов и взаимодействующими с ними атомами не были определены точно. Значительные отличия были обнаружены также в закономерностях лигандирования в структурах ФС II с разрешением 3.5Å, 3.0Å и 2.9Å [4, 6, 7]. В то время как большинство карбоксилат лигандов служили как монодентантные лиганды в структурах ФС II с разрешением 3.5Å и 3.0Å, в структуре ФС II с разрешением 2.9Å многие из них были определены как бидентантные лиганды. В итоге в структуре фотосистемы II с разрешением 1.9Å все аминокислотные остатки, являющиеся лигандами  $Mn_4CaO_5$ -кластера, были определены однозначно [8]. Как видно из таблицы 1 аминокислоты, относящиеся к субъединицам D1 и CP43 образуют в общей сложности шесть карбоксил лигандов и один гистидиновый лиганд, это остатки: D1–Asp170, D1–Glu189, D1–Glu333, D1–Asp342, D1–Ala344, CP43–Glu354 и D1–His332. Они составляют так называемую первую координационную сферу вокруг кластера. Среди них D1–Asp170, D1–Glu333, D1–Asp342, D1–Ala344 и CP43–Glu354 являются бидентантными лигандами, в то время как D1–Glu189 и D1–His332 – монодентантными лигандами. Эти аминокислотные остатки, в сочетании с оксо-мостиками и молекулами воды, образуют насыщенное окружение кластера. В таблице 1 показано, что существует шесть лигандов для каждого из четырех атомов Mn, и семь лигандов для атома Ca [8].

СТРУКТУРА И ВОЗМОЖНАЯ РОЛЬ ОСТАТКОВ ВТОРОЙ  
КООРДИНАЦИОННОЙ СФЕРЫ МАРГАНЦЕВОГО КЛАСТЕРА

В дополнение к близким лигандам  $Mn_4CaO_5$ -кластера описанным, выше, обнаружены три аминокислотных остатка, находящихся во второй координационной сфере кластера и имеющих возможное воздействие на кластер, это лиганды: D1–Asp61, D1–His337 и CP43–Arg357. Имидазол ε-азот D1–His337 напрямую связан водородной связью с атомом кислорода O3. Один из гуанидиновых η-азотов CP43–Arg357 образует водородные связи с атомами кислорода O2 и O4. Эти два аминокислотных остатка могут обеспечивать частичные положительные заряды для некоторой компенсации отрицательных зарядов,

вызванных оксо-мостиками и карбоксилат лигандами, тем самым стабилизируя структуру кластера. Иными словами, в отсутствие этих остатков некоторые из оксо-мостиков могут быть неустойчивыми и разрушаться за счет притяжения сильными положительными зарядами от пяти ионов металлов. Кроме того, остальные гуанидиновые  $\eta$ -азоты CP43–Arg357 образуют водородные связи с D1–Asp170 и D1–Ala344. Один из кислородов карбоксилатной группы D1–Asp61 образует водородную связь с молекулой воды W1, связанной с атомом Mn4, а другой кислород карбоксилатной группы D1–Asp61 образует водородную связь с молекулой W2 косвенно, посредством двух других молекул воды W8 и W9. Эти водородные связи также могут быть важным для стабилизации  $Mn_4CaO_5$ -кластера [30]. Такие выводы согласуются с целым рядом данных мутагенеза и функциональных исследований, свидетельствующих о важности этих трех аминокислотных остатков в сохранении функции выделения кислорода ФС II [31–35].

#### САЙТЫ СВЯЗЫВАНИЯ ИОНОВ $Cl^-$ В ФОТОСИСТЕМЕ II

Структурные исследования  $Br^-$  и  $I^-$ -замещенных ФС II [19, 36] выявили два  $Cl^-$ -связывающих участка на некотором удалении от  $Mn_4CaO_5$ -кластера. Однако, только один из этих сайтов был найден в немодифицированной структуре ФС II с разрешением 2.9 Å [7]. Так как оба месторасположения галогенов находятся на расстоянии 6–7 Å от  $Mn_4CaO_5$ -кластера были сомнения в том, что они являются природными местами связывания ионов  $Cl^-$  в ФС II [37]. Более того, в то время как в первом  $Cl^-$ -связывающем участке есть положительно заряженный остаток D1–Lys317, подобные остатки не обнаружены в непосредственной близости от второго сайта связывания  $Cl^-$  [19, 36]. Это предполагало, что связывание аниона в таком месте ФС II довольно слабое, и вследствие этого данный ион  $Cl^-$  не наблюдается в структуре ФС II дикого типа с уровнем разрешения 2.9 Å. Кроме того, предполагалось, что ион  $Cl^-$  напрямую связывается с  $Mn_4CaO_5$ -кластером, так как было показано, что удаление ионов  $Cl^-$  имеет заметный эффект на активность выделения кислорода, а также на свойства кластера [38, 39].

В структуре ФС II с разрешением 1.9 Å оба сайта связывания ионов  $Cl^-$  были отчетливо видны в электронной плотности [8], и их расположение оказалось таким же, как и описывалось ранее – на значительном удалении от  $Mn_4CaO_5$ -кластера [19, 36]. Это было подтверждено и на разностной аномальной карте Фурье, полученной при длине волны 1.75Å, где  $Cl^-$  ионы имеют больший вклад, чем

«легкие» атомы, составляющие аминокислоты остатки. Разностная аномальная карта Фурье также показала, что не было никаких других  $\text{Cl}^-$  ионов в первой координационной сфере  $\text{Mn}_4\text{CaO}_5$ -кластера, и это исключает возможность того, что ион  $\text{Cl}^-$  напрямую связывается с ионами металлов кислород-выделяющего центра. Что, в свою очередь, согласуется с приведенными выше результатами о том, что у всех пяти атомов металла в кислород-выделяющем центре их валентности насыщены оксо-мостиками, аминокислотными остатками и молекулами воды, и нет необходимости в дополнительных взаимодействиях [30].

Первый  $\text{Cl}^-$  связывающий участок расположен на расстоянии 6.7 Å от атома  $\text{Mn}4$ , а второй ион  $\text{Cl}^-$  находится в 7.4 Å от атома  $\text{Mn}2$  (рис.3). В непосредственной близости на расстоянии 3.3 Å к первому из ионов  $\text{Cl}^-$  находится заряженный остаток D2–Lys317. В дополнение к лизину, первый ион  $\text{Cl}^-$  окружают две молекулы воды и азот основной цепи D1–Glu333. Со вторым ионом  $\text{Cl}^-$  взаимодействуют азоты основной цепи D1–Asn338 и CP43–Glu354, и две молекулы воды. Таким образом,  $\text{Cl}^-$ -связывающие сайты имеют аналогичные координационные среды, а именно, среди четырех групп атомов, окружающих каждый из двух  $\text{Cl}^-$ -связывающих сайтов, две молекулы воды и два аминокислотных остатка. Различные экспериментальные данные показывают, что ионы  $\text{Cl}^-$  в ФС II могут быть легко удалены в ходе определенных процедур. В результате этого происходит нарушение выделения кислорода. Простое добавление  $\text{Cl}^-$  ионов к среде приводит к повторному включению ионов  $\text{Cl}^-$  в ФС II и восстановлению функции образования кислорода [38, 39]. Это может объясняться в частности тем, что оба аминокислотных остатка D1–Glu333 и CP43–Glu354 имеют карбоксилатные боковые группы, координированные с  $\text{Mn}_4\text{CaO}_5$ -кластером в виде бидентальных лигандов (табл. 1), а их азоты основной цепи связаны с двумя ионами  $\text{Cl}^-$ . Функция ионов  $\text{Cl}^-$  возможно заключается в фиксации структур этих двух аминокислотных остатков, необходимых для стабилизации связей в  $\text{Mn}_4\text{CaO}_5$ -кластере. Отсутствие ионов  $\text{Cl}^-$  может влиять на стабильную координацию этих остатков в  $\text{Mn}_4\text{CaO}_5$ -кластере, и в результате этого может происходить нарушение образования кислорода. В качестве альтернативной функции  $\text{Cl}^-$  ионов можно предположить, что оба эти иона могут функционировать для поддержки путей выхода протонов, так как они находятся в начале двух возможных путей выхода протонов из  $\text{Mn}_4\text{CaO}_5$ -кластера в люмен [4, 7, 8, 40–43].

В структуре ФС II высокого разрешения в дополнение к тому, что один атом  $\text{Ca}$  присутствует в  $\text{Mn}_4\text{CaO}_5$ -кластере и два иона  $\text{Cl}^-$  нахо-

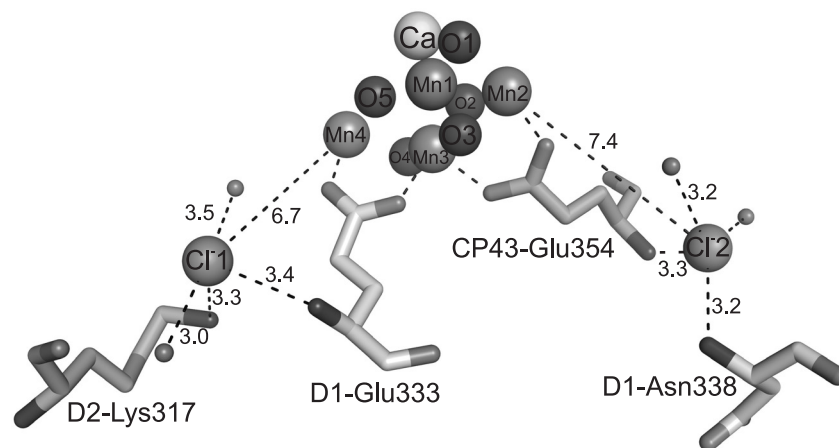


Рис. 3. Расположение ионов хлора относительно  $Mn_4CaO_5$ -кластера, длины связей указаны в ангстремах.

дятся в непосредственной близости к кластеру, имеются еще три дополнительных иона  $Ca^{2+}$  и один дополнительный ион  $Cl^-$ , располагающиеся на периферии фотосинтетического комплекса.

#### IV. РАСЧЕТЫ ПРОДУКТ/СУБСТРАТНЫХ КАНАЛОВ В ФОТОСИСТЕМЕ II

Кислород-выделяющий комплекс расположен в глубине люменальной части фотосистемы II, и воде требуется найти свой путь, перемещаясь сквозь белки к марганцевому кластеру [44]. Ограниченный доступ конкурентных аналогов воды к реакции расщепления привел к предположению о том, что сайт окисления воды защищен. Предполагается, что белки охраняют кислород-выделяющий комплекс от потенциально вредных молекул и сводят к минимуму побочные реакции с малыми молекулами, приносимыми водой. Поскольку ионы и клеточные восстановители могут конкурировать за места связывания и ухудшать расщепление воды, следовательно, их поступление является потенциально опасным. Последующие исследования подтвердили эту гипотезу, показав, что в отсутствие «внешних» субъединиц в ФС II образуется перекись водорода и снижается выделение кислорода [44]. Количество выделяющегося кислорода восстанавливается при добавлении веществ, способствующих агрегации белков. Доступ к кислород-выделяющему комплексу зондировали ESEEM (electron

spin echo envelope modulation) методом. Было показано, что уровень связывания спиртов с  $Mn_4CaO_5$ -кластером уменьшается с увеличением размера молекулы спирта. Это способствовало возникновению гипотезы о существовании водного канала внутри фотосистемы [45]. Высвобождение молекул  $O_2$  и протонов из каталитического центра так же предполагает наличие каналов для их выхода [46, 47]. Поэтому различными группами исследователей были выдвинуты предположения о наличии многочисленных каналов, образованных белковыми субъединицами ФС II, и образующими транспортную сеть, обеспечивающую быструю и эффективную доставку исходных веществ и удаление продуктов, что необходимо для круговорота молекул в ФС II. Поиск таких каналов стал возможным только после публикации кристаллической структуры ФС II с разрешением выше  $3.8 \text{ \AA}$  [4, 6].

Дж. Муррей с коллегами использовали программу *Caver* для поиска полостей в структуре фотосистемы II с разрешением  $3.5 \text{ \AA}$  [40]. Авторы нашли три канала. Они предположили, что самый широкий и наименее гидрофильный канал (i) предназначен для кислорода. Более полярный канал (ii) – для воды и протонов, и самый полярный канал (iii) предназначался только для протонов. Стоит обратить внимание на то, что алгоритм программы *Caver* проводит поиск кратчайших путей от заданной точки внутри белка к поверхности с выбранным минимальным диаметром. Поэтому применение этой программы смещает поиск каналов на обнаружение множества круглых «трубопроводов».

Позже, определение всех полостей рядом с кислород-выделяющим центром на основании структуры с разрешением  $3.0 \text{ \AA}$ , независимо от того где они выходят на поверхность, показало сложную систему возможных каналов транспортировки [41]. Подход, используемый в работе Ф. Хо с соавторами был шагом вперед в понимании того, как с помощью сети взаимосвязанных полостей и пор внутри белков вода переносится к активному центру ФС II. Дальнейшие исследования транспортных сетей внутри фотосистемы II продолжились на пространственной структуре с разрешением  $2.9 \text{ \AA}$ , которая была также проанализирована в программе *Caver* [7, 42]. Так как эта структура остается наиболее полной в настоящее время в плане белкового и липидного состава, за исключением молекул растворителя, полученные на ее основе каналы наиболее вероятны [42]. Возможные каналы авторами были рассчитаны с применением таких критериев, как диаметр канала, его длина и гидрофобность, а так же учитывалась координатная погрешность при уточнении структуры. В общей



Таблица 2.  
Сравнительная номенклатура продукт/субстрат каналов  
в ФС II, предложенная различными авторами

Васильев, 2012 [61]	1	2	3	4A	4B	5
Габдулхаков, 2009 [42]	D (C)	E,F	G	B1	B2	A1,A2
Хо и Стиринг, 2008 [41]	–	«Узкий»	Частично перекрывается с «широким»	«Большая система каналов»	«Большая система каналов»	«Обратный»
Мюррай и Барбер, 2007 [40]	iii	–	–	ii	ii	i

сложности были определены девять возможных каналов, соединяющих кислород-выделяющий центр с люменом. Они были обозначены как: A1, A2, B1, B2 и C–G (для сравнения с более ранними и поздними моделями каналов см. табл. 2). Было предположено, что в каналах C–G могут разместиться молекулы воды. Но на основе статической структурной модели каналы оказались слишком узкими, чтобы обеспечивать свободный проход молекулам H<sub>2</sub>O или O<sub>2</sub>. Поэтому, по мнению авторов, каналы C–G возможно служат путями выхода протонов. Интересно, что эти каналы начинаются в Mn<sub>4</sub>CaO<sub>5</sub>-кластере на противоположной стороне от иона Ca<sup>2+</sup> и частично каналы C и G объединены, образуя сайт взаимодействия с ионом Cl<sup>–</sup>. Ранее предполагалось, что Cl<sup>–</sup> ион может принимать участие в переносе протона [38]. Кроме того, ключевые аминокислотные остатки, считающиеся важными для высвобождения протонов такие как D1–Asp61, D1–Glu65 [48], распложены в этих каналах. Более широкие каналы имеют свое начало на «кальциевой стороне» Mn<sub>4</sub>CaO<sub>5</sub>-кластера. Каналы A1 и A2, возможно, участвуют в водоснабжении, их минимальный радиус 1.24Å и 1.38Å, соответственно. Каналы B1 и B2 несколько шире, их минимальный радиус 1.44Å, они имеют более гидрофобные стенки и, вероятно, могут участвовать в качестве путей вывода молекул кислорода. Канал B2 фактически заблокирован U–Lys134, который образует солевой мостик с V–Asp79 и тем самым соединяет две внешние субъединицы. Было показано [42], что конформационные изменения боковой группы U–Lys134 могли бы расширить диаметр канала с 2.3Å до 3.5Å и сделать B2 возможным путем диффузии молекулярного кислорода.

Для проверки возможных путей выхода диоксида, в нескольких экспериментальных работах [7, 42, 49] кристаллы ФС II были обработаны ксеноном (Xe). Давление благородного газа было подходящим инструментом для определения кислородных каналов в белках [50–52]. Обнаружению атомов Xe рентгеновским излучением способствует высокая плотность электронов в этих атомах. Молекулы Xe имеют размер схожий с молекулой O<sub>2</sub>, поэтому это газ используется для имитации кислорода в рентгеновской кристаллографии. Но в ФС II ксенон не вошел в предполагаемые кислородные каналы, а вместо этого заполнил мембранную часть комплекса. Поэтому авторы повторили эксперименты с другим благородным газом – криптоном (Kr), молекулы которого имеют меньший радиус [42]. Атомы Kr были найдены в каналах В1 и В2. Доступность этих каналов для малых молекул была также продемонстрирована путем совместной кристаллизации ФС II с диметилсульфоксидом (ДМСО) [42]. Две молекул ДМСО были обнаружены в каналах В1 и В2 не далеко от сайтов связывания с молекулами Kr. Таким образом, авторы предполагают, что именно каналы В1 и В2 отвечают за диффундирование молекул кислорода из КВК.

Все вышеизложенные исследования по выявлению водных каналов в ФС II были основаны на анализе полостей внутри структуры, полученной методом рентгеноструктурного анализа. Но в этом подходе существует два недостатка: во-первых, наличие полости в кристаллографической структуре не всегда означает, что она занята водой; а во-вторых, каналы в статической структуре имеют фиксированные границы и жесткую основу [40, 41]. Одним из способов решения этих проблем является оценка потенциала явного размещения молекул воды. Такой подход был использован в гибридном квантово-молекулярном исследовании кислород-выделяющего центра, в котором были промоделированы направленные к Mn<sub>4</sub>CaO<sub>5</sub>-кластеру цепи молекул воды, объединенные водородными связями, вдоль двух различных траекторий [53, 54]. Однако, эти исследования ограничились лишь небольшим участком ФС II, прилегающим к активному центру расщепления воды, и поэтому не обеспечили полноту картины расположения каналов.

При физиологических температурах тепловые движения внутри белков непрерывно изменяют сеть каналов и могут приводить к переходным состояниям открытия/закрытия некоторых каналов. [55] Эти процессы возможно играют решающее значение в контроле движения воды в ФС II [56]. Поэтому еще один интересный подход был предложен С.Васильевым с соавторами [43]. Они расположили моле-

кулы воды в энергетически выгодных местах во всех полостях белков, входящих в состав ФС II. Затем провели обработку методами молекулярной динамики всего комплекса ФС II, в том числе и воды, при физиологической температуре, что позволило отследить движение воды через белки. Таким образом, были обнаружены потоки воды во всех четырех каналах, описанных в работе Ф. Хо и С. Стайринга [41] и названных «широкий», «обратный», «узкий» и «большой». Полученные расчеты обнаружили значительные различия в конформации ФС II в присутствии и в отсутствии  $Mn_4CaO_5$ -кластера. Наибольшая разница наблюдалась в районе С-концевых доменов двух внешних белков PsbV и PsbU. Эти участки вовлечены в формирование широкого отверстия на конце «большого» канала в рассматриваемой модели ФС II с отсутствующим марганцевым кластером. Потенциальное участие белков PsbU и PsbV в регуляции ионного транспорта в ФС II подтверждается рядом экспериментальных наблюдений проводившихся ранее. Мутантные штаммы цианобактерий с делециями  $\Delta$ PsbV и  $\Delta$ PsbU характеризовались уменьшением выделения кислорода и потерей фотоавтотрофного роста в  $Ca^{2+}$  или  $Cl^-$  ограничивающих условиях [57, 58]. Кроме этого, мутант с удаленным белком PsbV был склонен к быстрой потере кислород-восстанавливающей активности в связи с потерей ионов металла в активном центре [59], а белок PsbU стабилизировал выделение кислорода при повышенных температурах. [60] Все эти результаты согласуются с активной ролью С-концевых доменов белков PsbU и PsbV в управлении транспортом молекул воды и ионов, наблюдаемой в данном молекулярно-динамическом моделировании.

Появление структуры фотосистемы II с разрешением 1.9Å [8] не позволило окончательно определить расположение продукт/субстратных каналов внутри нее, но уменьшило координационную ошибку в вычислениях. Хотя в структуре описаны положения более двух тысяч молекул воды, определение перемещения воды внутри ФС II затруднено, так как кристаллическая структура является статической моделью. Поэтому траектории водных каналов по-прежнему остаются вероятностными. К сожалению, авторам не удалось идентифицировать ни одной молекулы диоксида в структуре ФС II, и вопрос о «кислородном» канале так же остается открытым.

В связи с этим, разработка новых методов расчета каналов продолжается. Недавно в работе С.Васильева с коллегами [61] была применена методика постоянного «впрыска» новых молекул воды в область марганцевого кластера ФС II для ускорения движения молекул при молекулярно динамических расчетах. Это позволило

отследить траекторию движения воды в ФС II под давлением и определить энергию, необходимую для преодоления энергетических барьеров в каналах. После анализа энергии движения воды через каналы, было подтверждено проникновение воды через три водных канала, описанных в более ранних работах: «узкий» канал, «большая система каналов» и «широкий» канал [40, 41, 43]. Не подтвердилось просачивание воды через ранее выявленный «обратный» канал. Кроме того, наблюдалось проникновение воды через канал (обозначенный как канал 1 в работе С.Васильева [61]), который ранее предполагался как канал выхода протона [48].

Таким образом, четкое определение траектории каналов в таких больших комплексах как ФС II до сих пор является нетривиальной задачей даже для современных методов. Остается надеяться, что разработка рентгеновского лазера и съемка дифракционных данных на нем при физиологической температуре с высоким разрешением позволит в будущем с легкостью определить движения молекул внутри любого белка и комплекса. О прогрессе в данной области будет рассказано в главе VII.

## V. ПЛАСТОХИНОНЫ

По современным представлениям, первичная фотохимическая реакция в реакционном центре фотосистемы II заключается в переносе электрона от возбужденной молекулы хлорофилла P680 на молекулу феофитина. Этот процесс протекает за несколько пикосекунд, в результате образуется состояние с разделенными зарядами  $P680^+Ph^-$ , живущее лишь  $10^{-8}$ с вследствие рекомбинации зарядов. Однако этот процесс предотвращается благодаря более быстрому переносу электрона от  $Ph^-$  на молекулу акцептора электрона пластохинона  $Q_A$ . При этом теряется около 30% энергии, запасенной в результате первичного фотоакта, но образуется более стабильное состояние молекул. В конечном счете, электрон, оторванный от молекулы хлорофилла P680, передается на систему хиноновых переносчиков электрона, что приводит к стабилизации состояния реакционного центра с окисленным хлорофиллом P680. В данном случае молекулы пластохинона (PQ) действуют как фиксированные одноэлектронные передатчики ( $Q_A$ ) и мобильные двух электронные носители ( $Q_B$ ) в цепи переноса электронов от ФС II к ФС I через цит- $b_6f$ -комплекс. PQ-связывающие участки в ФС II расположены рядом с цитоплазматической стороной белка D1, образующей сайт связывания пластохи-

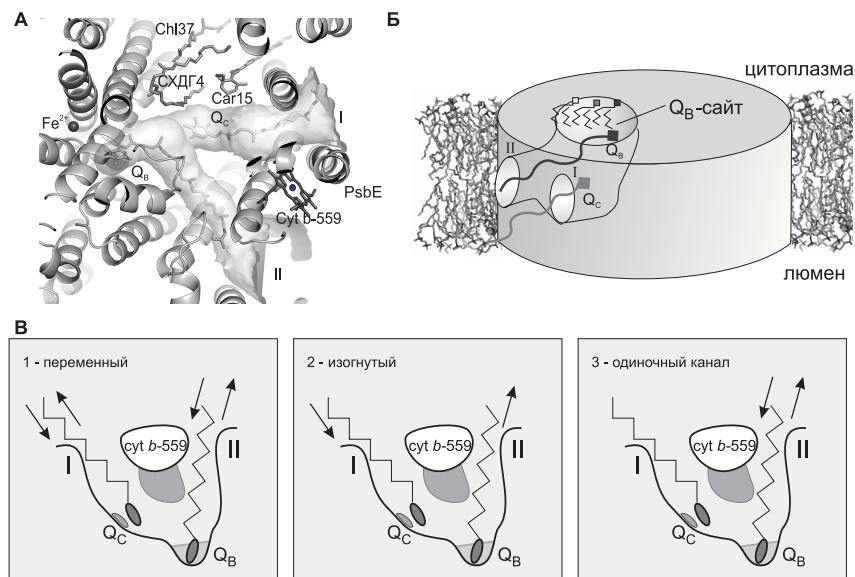


Рис. 4. А. Рассчитанные каналы I и II для PQ и PQH<sub>2</sub> обмена между пулом пластохинонов в мембране и Q<sub>B</sub> и Q<sub>C</sub> сайтами;

Б. Схематичное представление PQ и PQH<sub>2</sub> обменной полости в ФС II;

В. Возможные механизмы обмена PQ и PQH<sub>2</sub> между Q<sub>B</sub> сайтом и пулом PQ в мембране тилакоидов.

нона Q<sub>B</sub>, и белком D2, образующего сайт связывания Q<sub>A</sub>. Для переноса электронов молекул PQ должно быть достаточное количество и важным является быстрый обмен между PQ-связывающим сайтом и запасом свободных PQ, расположенных в тилакоидной мембране. Ранее была обнаружена большая полость внутри ФС II, которая возможно служит в качестве резервуара для PQ/PQH<sub>2</sub> [6] (рис. 4А). Эта полость ограничена белками: PsbJ, PsbK, D1, D2 и CP43, а также цитохромом b559. Она выстлана преимущественно гидрофобными аминокислотными остатками и наполнена фитольными цепями молекул хлорофиллов и феофитина, а также ацильными цепями липидов. Еще в полость выходит гем-группа цитохрома b559 и кольца молекул каротиноидов. Эта полость доступна для хинонов, находящихся внутри мембраны, через небольшое отверстие рядом с цит b559 (канал I) [6], кроме того, было выявлено второе отверстие (канал II) и локализован дополнительный пластохинон Q<sub>C</sub> [7] (рис. 4Б). Существование последнего находится в согласии с предложением

о новом сайте связывания PQ в ФСII недалеко от цит b559 [62, 63] и предположением о «запасных» пластохинонах, расположенных в непосредственной близости от сайта  $Q_B$ . [64, 65]. Наличие отдельного сайта для «запасного» пластохинона пока не получило подтверждения в структуре высокого разрешения, возможно из-за более высокой степени очистки препарата и высокой подвижности пластохинона  $Q_C$  [8]. Выход канала I имеет размеры примерно  $10 \times 20 \text{ \AA}^2$  и располагается между белками PsbJ и цитохромом b559. В то время как выход канала II с размерами  $12 \times 10 \text{ \AA}^2$  находится между белками PsbF и D2. Оба эти канала соединяют  $Q_B$ -сайт связывания с мембранной фазой. Такое расположение каналов хорошо соответствует быстрому обмену восстановленного пластохинола ( $PQH_2$ ) на свежий пластохинон из запаса PQ в тилакоидной мембране.

После восстановления / протонирования молекула  $PQH_2$  оставляет  $Q_B$  сайт и из запаса молекул PQ свежий пластохинон поступает в  $Q_B$  сайт для следующего цикла. Были предположены три возможных механизма обмена  $PQ/PQH_2$  [7] (рис. 4В). В первых двух механизмах вход / выход PQ и  $PQH_2$  происходит либо через один и тот же канал («alternative» – переменный механизм) или через разные каналы («wriggling» – изогнутый механизм, поскольку молекуле пластохинона необходимо изогнуться для смены канала). В переменном механизме каналы I и II используются попеременно для входа и выхода, тогда как в изогнутом механизме канал I используется только в качестве входа, а канал II только в качестве выхода для молекул PQ. В третьем механизме («single channel» – одиночный канал) вход и выход происходит только через канал II, канал I не участвует в  $PQ/PQH_2$  обмене.

## VI. МОНОМЕРНАЯ ФОРМА ФС II

В мембране тилакоидов фотосистема II существует как в димерной, так и в мономерной форме. Димерная форма ФС II выделялась и кристаллизовалась легче, чем ее мономерная форма, поэтому до 2010 г. структурно исследовались только природные или модифицированные фотосистемы II в димерной форме. Кристаллы димера ФС II, как правило, принадлежат к орторомбической пространственной группе  $P2_12_12_1$  и долгое время не могли преодолеть максимум разрешения в  $2.9 \text{ \AA}$  [7]. К тому же дифракционная картина была анизотропной, т.е. предел разрешения менялся от ориентации кристалла в рентгеновском луче, что ограничивало полезную разрешающую способность кристаллов димерной формы ФС II [6, 66]. М. Бразер и коллеги предположили, что кристаллизация мономер-



ров ФС II позволит изменить упаковку в кристалле и улучшить их качество, а так же позволит выявить факторы, влияющие на олигомеризацию фотосистемы II [67]. В результате удалось закристаллизовать и получить первую рентгеновскую структурную модель мономера ФС II с разрешением 3.6 Å из *T. elongatus* [67]. Качество данных позволило однозначно определить положение основных девятнадцати полипептидных субъединиц, образующих активный фотосинтетический комплекс, но серьезных изменений по сравнению со структурой димерных форм ФС II обнаружено не было. Отсутствовала электронная плотность для периферийной субъединицы PsbY, хотя ее присутствие, по мнению авторов, не привело бы к стерическим конфликтам внутри кристалла мономерной формы ФС II [67]. Тем не менее, белок PsbY был обнаружен с помощью МАЛДИ анализа в 80% растворенных кристаллов мономерной формы ФС II. Этот факт авторы объяснили неполной занятостью позиции этой субъединицы или неупорядоченностью белка PsbY в мономере фотосистемы II. В димерной форме ФС II электронная плотность для этой субъединицы была видна при разрешении 3.8 Å [1] и 2.9 Å [7], но отсутствовала в структурах с разрешением 3.5 Å [4] и 1.9 Å [8], на этом основании предполагалось, что белок PsbY свободно ассоциирован с фотокомплексом.

Несмотря на низкое разрешение пространственной структуры мономера фотосистемы II, качество электронной плотности позволило надежно определить положение пигментов, таких как молекулы хлорофилла *a* и феофитина. А также подтвердилось расположение всех хлорофинов в реакционном центре и всех двадцати девяти молекул Chl*a*, связанных с антенными белками CP43 и CP47. Кроме того были определены позиции одиннадцати молекул β-каротинов. По сравнению с димерной формой ФС II, отсутствовала молекула β-каротина, расположенная на поверхности взаимодействия мономеров в димерных формах фотокомплекса, которая возможно отсоединилась при выделении препарата мономерной формы ФС II. Для пластохинонов так же были найдены фрагменты электронной плотности в сайтах связывания Q<sub>A</sub>, Q<sub>B</sub>, Q<sub>C</sub>, но однозначно молекула пластохинона была обнаружена только в положении для Q<sub>A</sub> в позиции практически идентичной расположению Q<sub>A</sub> в димерной форме ФС II [7].

Электронная плотность модели мономерной формы фотосистемы II позволила описать положение двадцати двух молекул липидов. Этот результат хорошо согласовался с данными о составе липидов в мономерных и димерных формах ФС II из *T. elongatus* [68]. В мономерной форме ФС II лишь пять молекул липидов находятся на

поверхности димеризации мономеров, располагаясь рядом с субъединицами D1, PsbT и PsbM, и образуя устойчивый комплекс с этими белками. По-видимому, липиды обладают структурной, а возможно и функциональной ролью в реакционном центре ФС II, участвуя в цикле восстановления субъединицы D1, а не только отвечают за димеризацию ФС II, как это предполагалось некоторыми авторами [7].

Белок-белковые контакты в димерной форме ФС II между мономерами осуществляет субъединица PsbM и ее симметричный партнер PsbM'. Было показано, что PsbM находится в одинаковом положении, как в мономерной форме ФС II так и димерной, но димеризация мономерных форм ФС II не происходила. Существуют данные о том, что после удаления белка PsbM из фотосинтетического комплекса в мезофильных цианобактериях *Synechocystis* PCC 6803, димерные формы ФС II еще формируются [69]. Это все подтверждает предположения о вторичности прямых белок-белковых контактов при димеризации фотосистемы II [7].

## VII. ФЕМТОСЕКУНДНАЯ ДИФРАКЦИЯ МИКРОКРИСТАЛЛОВ ФС II

Для выяснения структуры и механизма работы каталитического центра фотосистемы II в последние десятилетия применялись различные спектроскопические методы исследования [70–72], а так же методы рентгеновской дифракции (РД) с использованием синхротронного излучения (СИ) [1, 3, 4, 6–8]. Среди многочисленных подходов, рентгеноструктурный анализ (РСА), несомненно, является наилучшим для получения детальной структуры  $Mn_4CaO_5$ -кластера и фотосистемы II в целом. Тем не менее, критической проблемой для рентгеноструктурных исследований является чувствительность к излучению, присущая редокс-активному высоко валентному  $Mn_4CaO_5$ -кластеру. Исследования рентгеновской спектроскопии показали, что радиационные повреждения в  $Mn_4CaO_5$ -кластере приводят к снижению степени окисления атомов марганца Mn<sup>(III)</sup> и Mn<sup>(IV)</sup>, присутствующих в неповрежденном каталитическом центре до Mn<sup>(II)</sup> [20, 21]. На основании исследований радиационных повреждений был сделан вывод, что во всех современных рентгеноструктурных исследованиях происходит снижение степени окисления  $Mn_4CaO_5$ -кластера примерно на 25% [8], а иногда и до 80% [1, 3, 4, 6, 7]. Подобные изменения происходят, несмотря на то, что все измерения рентгеновской дифракции проводятся при низких температурах в 100–150 К.

Методом EXAFS (Extended X-ray absorption fine structure) было показано, что радиационные повреждения увеличивают расстояния между атомами Mn–Mn и Mn–лиганд по сравнению с неповрежденным  $Mn_4CaO_5$ -кластером [20]. В результате происходит не только снижение степени окисления атомов марганца, но также и разрушение структуры самого кластера. В настоящее время общепризнано, что для металлосодержащих белков трудно получить неповрежденные структуры с использованием синхротронного излучения на основе рентгеновской дифракции даже при криогенных температурах. Следует также отметить, что процедура замораживания в некоторых белках приводит к конформационным изменениям [73].

Недавно на линейном ускорителе (LCLS) в США был продемонстрирован новый подход в белковой кристаллографии с использованием ультракоротких рентгеновских импульсов высокой интенсивности на кристаллических образцах с размерами в диапазоне 0.1–10 мкм [74–81]. Использование очень коротких менее 70 фс импульсов позволяет собрать дифракционные данные при комнатной температуре до начала радиационного повреждения [80–83]. Этот метод получения данных «до разрушения образца» не только устранил проблему радиационного повреждения, но и открыл пути для исследований ферментных систем методами рентгеноструктурного анализа при комнатной температуре с фемтосекундным временным диапазоном. Таким образом, стало возможным использовать различные системы запуска химических реакций, таких как фотоактивация или химический раздражитель, и все это позволяет исследовать химическую и структурную динамику различных процессов. В результате группой авторов было показано, что микрокристаллы ФС II могут быть использованы для получения данных рентгеноструктурного анализа при комнатной температуре с использованием ультракоротких менее 50 фс рентгеновских импульсов [84]. Наблюдались отдельные дифракционные точки при разрешении в 5.4 Å, а полный набор данных был получен с разрешением 6.5 Å. Карта электронной плотности ФС II не имела серьезных отличий от данных, полученных ранее на синхротронном излучении и усеченных до 6.5 Å разрешения [7]. Плотность в области  $Mn_4CaO_5$ -кластера присутствовала, доказывая, что  $Mn_4CaO_5$ -кластер не успел разрушиться под воздействием интенсивных рентгеновских импульсов, которые были в несколько раз более значительны, чем те, что используются на источниках синхротронного излучения. Это пробное исследование послужило основой для последующей комбинации различных

методов, которые позволили провести детальные исследования промежуточных состояний ФС II.

В то время как рентгеновская кристаллография является важным методом исследования геометрической структуры целых комплексов, рентгеновская абсорбция и эмиссионная спектроскопия представляют собой мощные методы для изучения химии неорганических систем и металлосодержащих белков. Рентгеновская абсорбционная спектроскопия (X-ray absorption spectroscopy – XAS) уже давно применяется в различных системах с использованием синхротронного излучения [85] и последние достижения в этом направлении исследований позволяют проводить эксперименты с временным разрешением в пикосекундной области [86–89]. В последние годы спектроскопия рентгеновского излучения (X-ray Emission Spectroscopy – XES) все чаще используется на источниках синхротронного излучения для исследования металлосодержащих белков [90–92], геохимических систем [93, 94], координационных комплексов [95, 96] и неорганических каталитических центров. В дополнение к XAS методу, XES измерения занятости электронных уровней предоставляют информацию об электронной структуре, заряде, спиновой плотности и природе лигандов [97–99].

Промежуточные химические состояния каталитических центров, в частности, в биологических системах, традиционно изучались замороженными [90]. Однако, этот подход не позволяет наблюдать за структурными изменениями в широком временном диапазоне в реальном времени. Спектроскопия на основе рентгеновского лазера на свободных электронах (X-ray free-electron laser – XFEL) имеет потенциал для преодоления этих ограничений. Принимая во внимание, что исследования на основе синхротронного излучения, как правило, ограничиваются пикосекундным временным разрешением [89], рентгеновская спектроскопия в XFEL может быть использована для изучения динамики электронной структуры в фемтосекундный промежуток времени. Кроме того, большой поток импульсов XFEL позволяет за короткий период времени собрать данные с разбавленных образцов или со слабым эмиссионным сигналом.

В США была разработана экспериментальная установка для одновременного сбора данных рентгеноструктурного анализа и спектроскопии рентгеновского излучения XES на LCLS [100, 101]. XES была использована для определения целостности электронного состояния  $Mn_4CaO_5$ -кластера. Микрокристаллы ФС II адаптированные в темноте отражали рентгеновские лучи до 4.1 Å. Спектр, собранный с кристаллов ФС II, очень хорошо соотносился со спектром, полученным с

темно-адаптированных ФС II в свободном состоянии, т.е. в состоянии  $S_1$ . Это означало, что в кластере атомы марганца находятся в том же высоко валентном состоянии ( $Mn_2^{III}Mn_2^{IV}$ ) как в растворе, так и в кристалле, и следовательно, процедура кристаллизации не меняет  $S_1$  состояние ФС II. Затем были проведены измерения рентгеновской дифракции состояния  $S_2$  при комнатной температуре, которое было получено с помощью видимого лазера накачки, и проведено сравнение с данными рентгеноструктурного анализа ФС II в темновом состоянии  $S_1$ . Переход образца ФС II в состояние  $S_2$  был протестирован с использованием меченых молекул воды  $H_2^{18}O$ . Анализ меченых форм  $O_2$  произведенных в зависимости от количества вспышек лазера показал, что  $S_2$  состояние РЦ ~ 80% случаях было достигнуто с одной вспышки. Авторами [101] был получен набор дифракционных данных с разрешением 5.9 Å с кристаллов ФС II в  $S_2$  состоянии. Сравнение данных показало, что воздействие светом не приводит к распаду или изменению качества кристалла. Более того, предполагается, что нет крупных структурных изменений в фотосинтетическом комплексе при переходе реакционного центра из состояния  $S_1$  в  $S_2$ .

Таким образом, было установлено, что одновременные PCA и XES исследования с использованием ультра-коротких ультра-ярких рентгеновских импульсов в LCLS позволяют исследовать нетронутыми атомные структуры микрокристаллов ФС II и оставляют неповрежденной электронную структуру  $Mn_4CaO_5$ -кластера при комнатной температуре. XES также служит методом контроля целостности металла каталитических центров во время сбора данных PCA. Этот метод может быть использован для будущих исследований управляемых светом структурных изменений внутри белковой составляющей фотосистемы II и пигментов, а также химической реакции в каталитическом центре в различных функциональных состояниях. Ожидается, что этот метод будет применяться ко многим металло-содержащим ферментам, в том числе и тем, которые, как известно, очень чувствительны к фото и радиационным повреждениям, в широком временном диапазоне, начиная с фемтосекунд.

### VIII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Структурные исследования фотосистемы II из цианобактерий привели к созданию пространственной модели этого огромного комплекса с высоким разрешением. В результате стало известно, что мономер фотоконплекса состоит из двадцати белковых субъединиц, пятидесяти четырех молекул пигментов, двадцати пяти молекул встроенных липидов, а также в нем присутствуют ионы марганца, кальция, хлора, железа и бикарбоната. На основе структурных данных были предложены механизмы работы подвижных переносчиков электронов. Была определена структура марганцевого кластера, осуществляющего реакцию разложения воды до атмосферного кислорода, протонов и электронов. Детально описана система координации атомов кластера белковым окружением. Однако, что происходит с марганцевым кластером и его окружением в процессе окисления и переходов из состояния  $S_0$  в состояние  $S_4$  еще только предстоит выяснить. В ходе многочисленных исследований была обнаружена разветвленная сеть каналов внутри фотосистемы II, соединяющая  $Mn_4CaO_5$ -кластер с люменом. Предполагается, что она предназначена для транспортировки субстратов и продуктов реакции в процессе фоторазложения воды. Возможный механизм и направление движения в этой транспортной сети остается на уровне гипотез. Внутри тилакоидной мембраны цианобактерий ФС II присутствует как в мономерной, так и в димерной форме. К сожалению, кристаллические структуры этих форм фотосистемы II не смогли объяснить причин диммеризации комплекса. Таким образом, фотосистема II, представляющая собой уникальный природный фотосинтетический комплекс, по-прежнему, остается слабоизученным объектом исследований современной фундаментальной и прикладной науки.

Появление новейших установок синхротронного излучения и их комбинация с другими методами исследований химических и физических свойств атомов позволяют надеяться на переход структурного анализа, на иной качественный уровень. В результате появится возможность изучать не только замороженные статические структуры биомолекул в начальной или в финальной стадии реакции, но и в промежуточных состояниях, происходящих в фемтосекундном временном диапазоне при физиологической температуре. Такие подходы помогут в деталях исследовать движения атомов внутри фотосистемы, а также подробно изучить процесс разложения воды в целом.



## ЛИТЕРАТУРА

1. Zouni, A., Witt, H.T., Kern, J., Fromme, P., Krauss, N., Saenger, W. and Orth, P. (2001) *Nature*, **409**, 739–743.
2. Zouni, A., Jordan, R., Schlodder, E., Fromme, P. and Witt, H.T. (2000) *Biochim. Biophys. Acta*, **1457**, 103–105.
3. Kamiya, N. and Shen, J.R. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 98–103.
4. Ferreira, K.N., Iverson, T.M., Maghlaoui, K., Barber, J. and Iwata, S. (2004) *Science*, **303**, 1831–1838.
5. Biesiadka, J., Loll, B., Kern, J., Irrgang, K.-D. and Zouni, A. (2004) *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **6**, 4733–4736.
6. Loll, B., Kern, J., Saenger, W., Zouni, A. and Biesiadka, J. (2005) *Nature*, **438**, 1040–1044.
7. Guskov, A., Kern, J., Gabdulkhakov, A., Broser, M., Zouni, A. and Saenger, W. (2009) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **16**, 334–342.
8. Umena, Y., Kawakami, K., Shen, J.R. and Kamiya, N. (2011) *Nature*, **473**, 55–60.
9. Adachi, H., Umena, Y., Enami, I., Henmi, T., Kamiya, N. and Shen, J.R. (2009) *Biochim. Biophys. Acta*, **1787**, 121–128.
10. Raymond, J. and Blankenship, R.E. (2004) *Biochim. Biophys. Acta.*, **1655**, 133–139.
11. Sakurai, I., Shen, J.R., Leng, J., Ohashi, S., Kobayashi, M. and Wada, H. (2006) *J. Biochem. (Tokyo)*, **140**, 201–209.
12. Kern, J. and Guskov, A. (2011) *J. Photochem. Photobiol. B*, **104**, 19–34.
13. Baena-Gonzalez, E. and Aro, E.M. (2002) *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, **357**, 1451–1459.
14. Barbato, R., Friso, G., Rigoni, F., Dalla Vecchia, F. and Giacometti, G.M. (1992) *J. Cell Biol.*, **119**, 325–335.
15. Rokka, A., Suorsa, M., Saleem, A., Battchikova, N. and Aro, E.M. (2005) *Biochem. J.*, **388**, 159–168.
16. Kok, B., Forbush, B. and McGloin, M. (1970) *Photochem. Photobiol.*, **11**, 457–75.
17. Joliot, P. (2003) *Photosynth. Res.*, **76**, 65–72.
18. Renger, G. and Renger, T. (2008) *Photosynth. Res.*, **98**, 53–80.
19. Kawakami, K., Umena, Y., Kamiya, N. and Shen, J.R. (2009) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**, 8567–8572.
20. Yano, J., Kern, J., Irrgang, K.D., Latimer, M.J., Bergmann, U., Glatzel, P., Pushkar, Y., Biesiadka, J., Loll, B., Sauer, K., Messinger, J., Zouni, A., and Yachandra, V.K. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 12047–12052.
21. Grabolle, M., Haumann, M., Muller, C., Liebisch, P. and Dau, H. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 4580–4588.
22. Yano, J., Kern, J., Sauer, K., Latimer, M.J., Pushkar, Y., Biesiadka, J., Loll, B., Saenger, W., Messinger, J., Zouni, A., and Yachandra, V.K. (2006) *Science*, **314**, 821–825.
23. Siegbahn, P.E. (2008) *Chemistry*, **14**, 8290–8302.
24. Siegbahn, P.E. (2009) *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 18238–18239.
25. Hoganson, C.W. and Babcock, G.T. (1997) *Science*, **277**, 1953–1956.
26. Tommos, C. and Babcock, G.T. (2000) *Biochim. Biophys. Acta*, **1458**, 199–219.
27. Vrettos, J.S., Limburg, J. and Brudvig, G.W. (2001) *Biochim. Biophys. Acta*, **1503**, 229–245.

28. Renger, G. (2001) *Biochim. Biophys. Acta*, **1503**, 210–228.
29. Hays, A.M., Vassiliev, I.R., Golbeck, J.H. and Debus, R.J. (1999) *Biochemistry*, **38**, 11851–11865.
30. Kawakami, K., Umena, Y., Kamiya, N. and Shen, J.R. (2011) *J. Photochem. Photobiol. B*, **104**, 9–18.
31. Nixon, P.J. and Diner, B.A. (1994) *Biochem. Soc. Trans.*, **22**, 338–343.
32. Chu, H.A., Nguyen, A.P. and Debus, R.J. (1995) *Biochemistry*, **34**, 5839–5858.
33. Hwang, H.J., Dilbeck, P., Debus, R.J. and Burnap, R.L. (2007) *Biochemistry*, **46**, 11987–11997.
34. Debus, R.J. (2008) *Coord. Chem. Rev.*, **252**, 244–258.
35. Service, R.J., Hillier, W. and Debus, R.J. (2010) *Biochemistry*, **49**, 6655–6669.
36. Murray, J.W. (2008) *Energy Environ. Sci.*, **1**, 161–166.
37. Guskov, A., Gabdulkhakov, A., Broser, M., Glockner, C., Hellmich, J., Kern, J., Frank, J., Muh, F., Saenger, W. and Zouni, A. (2010) *Chemphyschem.*, **11**, 1160–1171.
38. Olesen, K. and Andreasson, L.E. (2003) *Biochemistry*, **42**, 2025–2035.
39. Popelkova, H. and Yocum, C.F. (2007) *Photosynth. Res.*, **93**, 111–121.
40. Murray, J.W. and Barber, J. (2007) *J. Struct. Biol.*, **159**, 228–237.
41. Ho, F.M. and Stryng, S. (2008) *Biochim. Biophys. Acta.*, **1777**, 140–153.
42. Gabdulkhakov, A., Guskov, A., Broser, M., Kern, J., Muh, F., Saenger, W. and Zouni, A. (2009) *Structure*, **17**, 1223–1234.
43. Vassiliev, S., Comte, P., Mahboob, A. and Bruce, D. (2010) *Biochemistry*, **49**, 1873–1881.
44. Klimov, V.V., Ananyev, G.M., Zastryzhnaya, O.M., Wydrzynski, T., and Renger, G. (1993) *Photosynth. Res.*, **38**, 409–416.
45. Force, D.A., Randall, D.W., Lorigan, G.A., Clemens, K.L. and Britt, R.D. (1998) *Journal American Chemical Society*, **120**, 13321–13333.
46. Anderson, J.M. and Chow, W.S. (2002) *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, **357**, 1421–1430.
47. Wraight, C.A. (2006) *Biochim. Biophys. Acta.*, **1757**, 886–912.
48. Ishikita, H., Saenger, W., Loll, B., Biesiadka, J. and Knapp, E.W. (2006) *Biochemistry*, **45**, 2063–2071.
49. Murray, J.W., Maghlaoui, K., Kargul, J., Sugiura, M. and Barber, J. (2008) *Photosynth. Res.*, **98**, 523–527.
50. Prange, T., Schiltz, M., Pernot, L., Colloc'h, N., Longhi, S., Bourguet, W. and Fourme, R. (1998) *Protein-Structure Function and Genetics*, **30**, 61–73.
51. Cohen, J., Arkhipov, A., Braun, R. and Schulten, K. (2006) *Biophys. J.*, **91**, 1844–1857.
52. Luna, V.M., Chen, Y., Fee, J.A. and Stout, C.D. (2008) *Biochemistry*, **47**, 4657–4665.
53. Sproviero, E.M., Gascon, J.A., McEvoy, J.P., Brudvig, G.W. and Batista, V.S. (2008) *Coord. Chem. Rev.*, **252**, 395–415.
54. Sproviero, E.M., McEvoy, J.P., Gascon, J.A., Brudvig, G.W. and Batista, V.S. (2008) *Photosynth. Res.*, **97**, 91–114.
55. Cohen, J., Kim, K., King, P., Seibert, M. and Schulten, K. (2005) *Structure*, **13**, 1321–1329.
56. Ho, F.M. (2008) *Photosynth. Res.*, **98**, 503–522.
57. Shen, J.R., Ikeuchi, M. and Inoue, Y. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 17821–17826.
58. Shen, J.R., Vermaas, W. and Inoue, Y. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 6901–6907.

59. Li, Z., Andrews, H., Eaton-Rye, J.J. and Burnap, R.L. (2004) *Biochemistry*, **43**, 14161–14170.
60. Nishiyama, Y., Los, D.A., Hayashi, H. and Murata, N. (1997) *Plant Physiol.*, **115**, 1473–1480.
61. Vassiliev, S., Zارايسкая, T. and Bruce, D. (2012) *Biochim. Biophys. Acta*, **1817**, 1671–1678.
62. Kruk, J. and Strzalka, K. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 86–91.
63. Kaminskaya, O., Shuvalov, V.A. and Renger, G. (2007) *Biochemistry*, **46**, 1091–1105.
64. Kern, J., Loll, B., Lüneberg, C., DiFiore, D., Biesiadka, J., Irrgang, K.D. and Zouni, A. (2005) *Biochim. Biophys. Acta*, **1706**, 147–157.
65. Krivanek, R., Kern, J., Zouni, A., Dau, H. and Haumann, M. (2007) *Biochim. Biophys. Acta*, **1767**, 520–527.
66. Kern, J., Loll, B., Biesiadka, J., Zouni, A., Irrgang, K.-D. and Saenger, W. (2005) *Photosynth. Res.*, **84**, 153–159.
67. Broser, M., Gabdulkhakov, A., Kern, J., Guskov, A., Muh, F., Saenger, W. and Zouni, A. (2010) *J. Biol. Chem.*, **285**, 26255–26262.
68. Loll, B., Kern, J., Saenger, W., Zouni, A. and Biesiadka, J. (2007) *Biochim. Biophys. Acta*, **1767**, 509–519.
69. Bentley, F.K., Luo, H., Dilbeck, P., Burnap, R.L. and Eaton-Rye, J.J. (2008) *Biochemistry*, **47**, 11637–11646.
70. Yano, J. and Yachandra, V.K. (2008) *Inorg. Chem.*, **47**, 1711–1726.
71. Haumann, M., Liebisch, P., Müller, C., Barra, M., Grabolle, M. and Dau, H. (2005) *Science*, **310**, 1019–1021.
72. Messinger, J., Badger, M. and Wydrzynski, T. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 3209–3213.
73. Fraser, J.S., van den Bedem, H., Samelson, A.J., Lang, P.T., Holton, J.M., Echols, N. and Alber, T. (2011) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 16247–16252.
74. Chapman, H.N., Fromme, P., Barty, A., White, T.A., Kirian, R.A., Aquila, A., Hunter, M.S., Schulz, J., DePonte, D.P., Weierstall, U., Doak, R.B., Maia, F.R., Martin, A.V., Schlichting, I., Lomb, L., Coppola, N., Shoeman, R.L., Epp, S.W., Hartmann, R., Rolles, D., Rudenko, A., Foucar, L., Kimmel, N., Weidenspointner, G., Holl, P., Liang, M., Barthelmess, M., Caleman, C., Boutet, S., Bogan, M.J., Krzywinski, J., Bostedt, C., Bajt, S., Gumprecht, L., Rudek, B., Erk, B., Schmidt, C., Homke, A., Reich, C., Pietschner, D., Struder, L., Hauser, G., Gorke, H., Ullrich, J., Herrmann, S., Schaller, G., Schopper, F., Soltau, H., Kuhnle, K.U., Messerschmidt, M., Bozek, J.D., Hau-Riege, S.P., Frank, M., Hampton, C.Y., Sierra, R.G., Starodub, D., Williams, G.J., Hajdu, J., Timneanu, N., Seibert, M.M., Andreasson, J., Røcker, A., Jonsson, O., Svenda, M., Stern, S., Nass, K., Andritschke, R., Schroter, C.D., Krasniqi, F., Bott, M., Schmidt, K.E., Wang, X., Grotjohann, I., Holton, J.M., Barends, T.R., Neutze, R., Marchesini, S., Fromme, R., Schorb, S., Rupp, D., Adolph, M., Gorkhover, T., Andersson, I., Hirsemann, H., Potdevin, G., Graafsma, H., Nilsson, B., and Spence, J.C. (2011) *Nature*, **470**, 73–77.
75. Kirian, R.A., White, T.A., Holton, J.M., Chapman, H.N., Fromme, P., Barty, A., Lomb, L., Aquila, A., Maia, F.R., Martin, A.V., Fromme, R., Wang, X., Hunter, M.S., Schmidt, K.E., and Spence, J.C. (2011) *Acta Crystallogr. A*, **67**, 131–140.
76. Hunter, M.S., DePonte, D.P., Shapiro, D.A., Kirian, R.A., Wang, X., Starodub, D., Marchesini, S., Weierstall, U., Doak, R.B., Spence, J.C., and Fromme, P. (2011) *Biophys. J.*, **100**, 198–206.

77. Johansson, L.C., Arnlund, D., White, T.A., Katona, G., Deponte, D.P., Weierstall, U., Doak, R.B., Shoeman, R.L., Lomb, L., Malmerberg, E., Davidsson, J., Nass, K., Liang, M., Andreasson, J., Aquila, A., Bajt, S., Barthelmess, M., Barty, A., Bogan, M.J., Bostedt, C., Bozek, J.D., Caleman, C., Coffee, R., Coppola, N., Ekeberg, T., Epp, S.W., Erk, B., Fleckenstein, H., Foucar, L., Graafsma, H., Gumprecht, L., Hajdu, J., Hampton, C.Y., Hartmann, R., Hartmann, A., Hauser, G., Hirsemann, H., Holl, P., Hunter, M.S., Kassemeyer, S., Kimmel, N., Kirian, R.A., Maia, F.R., Marchesini, S., Martin, A.V., Reich, C., Rolles, D., Rudek, B., Rudenko, A., Schlichting, I., Schulz, J., Seibert, M.M., Sierra, R.G., Soltau, H., Starodub, D., Stellato, F., Stern, S., Struder, L., Timneanu, N., Ullrich, J., Wahlgren, W.Y., Wang, X., Weidenspointner, G., Wunderer, C., Fromme, P., Chapman, H.N., Spence, J.C., and Neutze, R. (2012) *Nat. Methods*, **9**, 263–265.
78. Koopmann, R., Cupelli, K., Redecke, L., Nass, K., Deponte, D.P., White, T.A., Stellato, F., Rehders, D., Liang, M., Andreasson, J., Aquila, A., Bajt, S., Barthelmess, M., Barty, A., Bogan, M.J., Bostedt, C., Boutet, S., Bozek, J.D., Caleman, C., Coppola, N., Davidsson, J., Doak, R.B., Ekeberg, T., Epp, S.W., Erk, B., Fleckenstein, H., Foucar, L., Graafsma, H., Gumprecht, L., Hajdu, J., Hampton, C.Y., Hartmann, A., Hartmann, R., Hauser, G., Hirsemann, H., Holl, P., Hunter, M.S., Kassemeyer, S., Kirian, R.A., Lomb, L., Maia, F.R., Kimmel, N., Martin, A.V., Messerschmidt, M., Reich, C., Rolles, D., Rudek, B., Rudenko, A., Schlichting, I., Schulz, J., Seibert, M.M., Shoeman, R.L., Sierra, R.G., Soltau, H., Stern, S., Struder, L., Timneanu, N., Ullrich, J., Wang, X., Weidenspointner, G., Weierstall, U., Williams, G.J., Wunderer, C.B., Fromme, P., Spence, J.C., Stehle, T., Chapman, H.N., Betzel, C., and Duszenko, M. (2012) *Nat. Methods*, **9**, 259–262.
79. Aquila, A., Hunter, M.S., Doak, R.B., Kirian, R.A., Fromme, P., White, T.A., Andreasson, J., Arnlund, D., Bajt, S., Barends, T.R., Barthelmess, M., Bogan, M.J., Bostedt, C., Bottin, H., Bozek, J.D., Caleman, C., Coppola, N., Davidsson, J., DePonte, D.P., Elser, V., Epp, S.W., Erk, B., Fleckenstein, H., Foucar, L., Frank, M., Fromme, R., Graafsma, H., Grothjohann, I., Gumprecht, L., Hajdu, J., Hampton, C.Y., Hartmann, A., Hartmann, R., Hau-Riege, S., Hauser, G., Hirsemann, H., Holl, P., Holton, J.M., Homke, A., Johansson, L., Kimmel, N., Kassemeyer, S., Krasniqi, F., Kuhnel, K.U., Liang, M., Lomb, L., Malmerberg, E., Marchesini, S., Martin, A.V., Maia, F.R., Messerschmidt, M., Nass, K., Reich, C., Neutze, R., Rolles, D., Rudek, B., Rudenko, A., Schlichting, I., Schmidt, C., Schmidt, K.E., Schulz, J., Seibert, M.M., Shoeman, R.L., Sierra, R., Soltau, H., Starodub, D., Stellato, F., Stern, S., Struder, L., Timneanu, N., Ullrich, J., Wang, X., Williams, G.J., Weidenspointner, G., Weierstall, U., Wunderer, C., Barty, A., Spence, J.C., and Chapman, H.N. (2012) *Opt. Express*, **20**, 2706–2716.
80. Barty, A., Caleman, C., and Chapman, H.N., et al. (2012) *Nature Photonics*, **6**, 35–40.
81. Lomb, L., Barends, T.R.M., Kassemeyer, S., Aquila, A., Epp, S.W., Erk, B., Foucar, L., Hartmann, R., Rudek, B., Rolles, D., Rudenko, A., Shoeman, R.L., Andreasson, J., Bajt, S., Barthelmess, M., Barty, A., Bogan, M.J., Bostedt, C., Bozek, J.D., Caleman, C., Coffee, R., Coppola, N., DePonte, D.P., Doak, R.B., Ekeberg, T., Fleckenstein, H., Fromme, P., Gebhardt, M., Graafsma, H., Gumprecht, L., Hampton, C.Y., Hartmann, A., Hauser, G., Hirsemann, H., Holl, P., Holton, J.M., Hunter, M.S., Kabsch, W., Kimmel,

- N., Kirian, R.A., Liang, M., Maia, F.R.N.C., Meinhart, A., Marchesini, S., Martin, A.V., Nass, K., Reich, C., Schulz, J., Seibert, M.M., Sierra, R., Soltau, H., Spence, J.C.H., Steinbrener, J., Stellato, F., Stern, S., Timneanu, N., Wang, X., Weidenpointner, G., Weierstall, U., White, T.A., Wunderer, C., Chapman, H.N., Ullrich, J., Strüder, L., and Schlichting, I. (2011) *Physical Review B*, **84**, 214111–214116.
82. Coleman, C., Huldt, G., Maia, F.R., Ortiz, C., Parak, F.G., Hajdu, J., van der Spoel, D., Chapman, H.N. and Timneanu, N. (2011) *ACS Nano*, **5**, 139–146.
83. Neutze, R., Wouts, R., van der Spoel, D., Weckert, E. and Hajdu, J. (2000) *Nature*, **406**, 752–757.
84. Kern, J., Alonso-Mori, R., Hellmich, J., Tran, R., Hattne, J., Laksmono, H., Glockner, C., Echols, N., Sierra, R.G., Sellberg, J., Lassalle-Kaiser, B., Gildea, R.J., Glatzel, P., Grosse-Kunstleve, R.W., Latimer, M.J., McQueen, T.A., DiFiore, D., Fry, A.R., Messerschmidt, M., Miahnahri, A., Schaefer, D.W., Seibert, M.M., Sokaras, D., Weng, T.C., Zwart, P.H., White, W.E., Adams, P.D., Bogan, M.J., Boutet, S., Williams, G.J., Messinger, J., Sauter, N.K., Zouni, A., Bergmann, U., Yano, J., and Yachandra, V.K. (2012) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 9721–9726.
85. Yano, J. and Yachandra, V.K. (2009) *Photosynth. Res.*, **102**, 241–254.
86. Chen, L.X. (2005) *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **56**, 221–254.
87. Bressler, C. and Chergui, M. (2010) *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **61**, 263–282.
88. March, A.M., Stickrath, A., Doumy, G., Kanter, E.P., Krassig, B., Southworth, S.H., Attenkofer, K., Kurtz, C.A., Chen, L.X. and Young, L. (2011) *Rev. Sci. Instrum.*, **82**, 073110–073118.
89. Vanko, G., Glatzel, P., Pham, V.T., Abela, R., Grolimund, D., Borca, C.N., Johnson, S.L., Milne, C.J. and Bressler, C. (2010) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **49**, 5910–5912.
90. Messinger, J., Robblee, J.H., Bergmann, U., Fernandez, C., Glatzel, P., Visser, H., Cinco, R.M., McFarlane, K.L., Bellacchio, E., Pizarro, S.A., Cramer, S.P., Sauer, K., Klein, M.P., and Yachandra, V.K. (2001) *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 7804–7820.
91. Pushkar, Y., Long, X., Glatzel, P., Brudvig, G.W., Dismukes, G.C., Collins, T.J., Yachandra, V.K., Yano, J. and Bergmann, U. (2010) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **49**, 800–803.
92. Lancaster, K.M., Roemelt, M., Ettenhuber, P., Hu, Y., Ribbe, M.W., Neese, F., Bergmann, U. and DeBeer, S. (2011) *Science*, **334**, 974–977.
93. Mori, R.A., Paris, E., Giuli, G., Eeckhout, S.G., Kavcic, M., Zitnik, M., Bucar, K., Pettersson, L.G. and Glatzel, P. (2010) *Inorg. Chem.*, **49**, 6468–6473.
94. Mori, R.A., Paris, E., Giuli, G., Eeckhout, S.G., Kavcic, M., Zitnik, M., Bucar, K., Pettersson, L.G.M. and Glatzel, P. (2009) *Analytical Chemistry*, **81**, 6516–6525.
95. Smolentsev, G., Soldatov, A.V., Messinger, J., Merz, K., Weyhermuller, T., Bergmann, U., Pushkar, Y., Yano, J., Yachandra, V.K. and Glatzel, P. (2009) *J. Am. Chem. Soc.*, **131**, 13161–13167.
96. Beckwith, M.A., Roemelt, M., Collob, M.N., DuBoc, C., Weng, T.C., Bergmann, U., Glatzel, P., Neese, F. and DeBeer, S. (2011) *Inorg. Chem.*, **50**, 8397–8409.
97. Glatzel, P. and Bergmann, U. (2005) *Coord. Chem. Rev.*, **249**, 65–95.
98. Bergmann, U., Horne, C.R., Collins, T.J., Workman, J.M. and Cramer, S.P. (1999) *Chemical Physics Letters*, **302**, 119–124.
99. Bergmann, U. and Glatzel, P. (2009) *Photosynth. Res.*, **102**, 255–266.



100. Alonso-Mori, R., Kern, J., Gildea, R.J., Sokaras, D., Weng, T.C., Lassalle-Kaiser, B., Tran, R., Hattne, J., Laksmono, H., Hellmich, J., Glockner, C., Echols, N., Sierra, R.G., Schafer, D.W., Sellberg, J., Kenney, C., Herbst, R., Pines, J., Hart, P., Herrmann, S., Grosse-Kunstleve, R.W., Latimer, M.J., Fry, A.R., Messerschmidt, M.M., Miahnahri, A., Seibert, M.M., Zwart, P.H., White, W.E., Adams, P.D., Bogan, M.J., Boutet, S., Williams, G.J., Zouni, A., Messinger, J., Glatzel, P., Sauter, N.K., Yachandra, V.K., Yano, J., and Bergmann, U. (2012) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 19103–19107.
101. Kern, J., Alonso-Mori, R., Tran, R., Hattne, J., Gildea, R.J., Echols, N., Glockner, C., Hellmich, J., Laksmono, H., Sierra, R.G., Lassalle-Kaiser, B., Koroidov, S., Lampe, A., Han, G., Gul, S., Difiore, D., Milathianaki, D., Fry, A.R., Miahnahri, A., Schafer, D.W., Messerschmidt, M., Seibert, M.M., Koglin, J.E., Sokaras, D., Weng, T.C., Sellberg, J., Latimer, M.J., Grosse-Kunstleve, R.W., Zwart, P.H., White, W.E., Glatzel, P., Adams, P.D., Bogan, M.J., Williams, G.J., Boutet, S., Messinger, J., Zouni, A., Sauter, N.K., Yachandra, V.K., Bergmann, U., and Yano, J. (2013) *Science*, **340**, 491–495.