

ВЛИЯНИЕ ТРЕГАЛОЗЫ НА ВЫДЕЛЕНИЕ КИСЛОРОДА И ПЕРЕНОС ЭЛЕКТРОНА В КОМПЛЕКСАХ ФОТОСИСТЕМЫ 2*

© 2015 М.Д. Мамедов^{1,2**}, И.О. Петрова¹,
Д.В. Яныкин², А.А. Заспа¹, А.Ю. Семенов^{1,3}

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, 119991 Москва;
факс: +7(495)939-3181, электронная почта: mahirmamedov@yandex.ru

² Институт фундаментальных проблем биологии РАН, 142290 Пущино
Московской обл.; факс: +7(496)733-0532, электронная почта: ya-d-ozh@rambler.ru

³ Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, 119991 Москва;
факс: +7(495)651-2191, электронная почта: semenov@genebee.msu.ru

Поступила в редакцию 14.07.14
После доработки 02.09.14

Пигмент-белковый комплекс фотосистемы 2 (ФС2) катализирует светозависимое окисление молекулы воды и восстановление пластохинона. В этой работе было изучено влияние уникального по своим физико-химическим характеристикам дисахарида трегалозы на изолированные комплексы ФС2. Показано, что трегалоза значительно стимулирует стационарную скорость выделения кислорода. При изучении кинетики спада флуоресценции в ответ на единичные вспышки света нами было продемонстрировано, что трегалоза не влияет на кинетику окисления первичного хинонного акцептора Q_A^- , но увеличивает относительную долю реакционных центров ФС2, способных окислять Q_A^- . Трегалоза также предотвращает инактивацию при длительном хранении образцов ФС2. Предположено, что в присутствии трегалозы в результате изменения гидратации комплекс ФС2 переходит в конформацию, более оптимальную для эффективного функционирования.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: фотосистема 2, комплекс окисления воды, выделение кислорода, трегалоза, флуоресценция хлорофилла, окисление пластохинона.

Основным источником энергии в биосфере является солнечный свет. Однако лишь организмы, осуществляющие окислительный фотосинтез, способны преобразовывать энергию фотонов, испускаемых солнцем, в энергию химических связей углеводов, расщепляя воду на молекулярный кислород с образованием восстановительных эквивалентов (электронов и протонов). Пигмент-белковый комплекс фотосистемы 2 (ФС2), погруженный в мембраны тилакоидов цианобактерий и хлоропластов, функционирует как светозависимая H_2O -пластохинон оксидо-

редуктаза [1, 2]. Все органические и неорганические редокс-кофакторы, участвующие в реакциях переноса заряда, локализованы на D1- и D2-субъединицах реакционного центра (РЦ). Mn_4CaO_5 -кластер наряду с его координирующими аминокислотными остатками и четырьмя молекулами воды образует каталитический сайт, где происходит окисление молекулы воды [3–7]. Следует отметить, что комплекс окисления воды (КОВ), который расположен на донорной стороне фермента, является наиболее лабильным сайтом в ФС2 и подвержен окислительно-му повреждению.

Биосинтез осмолитов, участвующих в стабилизации биологических макромолекул, – древнейшая эволюционная находка природы ([8–13] и ссылки в них). В присутствии этих небольших молекул фотосинтетические организмы способны более эффективно противостоять разным стрессовым воздействиям. В качестве осмолитов могут выступать разные сахара, полиолы, аминокислоты, их производные и т.д. В

Принятые сокращения: ФС2 – фотосистема 2; РЦ – реакционный центр; P680 – первичный донор электрона; Q_A и Q_B – первичный и вторичный хинонные акцепторы; Y_Z – редокс-активный тирозин 161 белка D1; Хл – хлорофилл; ДХММ – 3-(3,4-дихлорофенил)-1,1-диметилмочевина; КОВ – комплекс окисления воды.

* Первоначально английский вариант рукописи был опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow), Papers in Press, BM14-208, 28.12.2014.

** Адресат для корреспонденции.

последние годы большое внимание уделяется трегалозе, которая естественным образом вырабатывается некоторыми видами эубактерий, архей, грибов, беспозвоночных и низших растений [14, 15].

Особые физико-химические характеристики трегалозы, такие как относительная инертность гликозидной связи, существование как в кристаллическом, так и в аморфном состояниях, термостабильность (температура плавления 203°), высокая температура стеклования, высокая стабильность в широком диапазоне pH (3,5–10), высокая гидрофильность (растворимость в воде — 68 г на 100 мл), выделяют ее из ряда других осмолитов, таких как сахароза или глицерин.

Защитный эффект трегалозы по отношению к фотосинтетическому аппарату при абиотических стрессах (обезвоживание, высокая соленость и тепловой стресс) был продемонстрирован на примере трансгенных растений ([16, 17] и ссылки в них). Ранее было показано, что трегалоза предотвращает удаление растворимого пластоцианина из тилакоидного люмена при замораживании—оттаивании образцов [18]. Было также показано, что трегалоза защищает мембранные фрагменты ФС2 и мембраны хлоропластов при длительных и кратковременных замораживаниях [19]. Следует отметить, что сопряжение между переносом электрона и динамикой белка было подробно исследовано на фотосинтетических бактериальных реакционных центрах, включенных в стеклообразные матрицы с трегалозой [10, 20]. Эти данные свидетельствуют о том, что конформационные изменения, стабилизирующие разделение зарядов между фотоокисленным первичным донором электрона (P870⁺) и восстановленным первичным хинонным акцептором (Q_A⁻), происходят вблизи Q_A⁻ -связывающего сайта белка.

В настоящей работе изучалось влияние трегалозы на реакции переноса электронов внутри белкового матрикса ФС2 из шпината. Полученные данные показывают, что этот дисахарид значительно стимулирует активность комплекса окисления воды ФС2 и предотвращает инактивацию белка при хранении.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выделение ядерных комплексов и мембранных фрагментов ФС2 из шпината проводили по методике, описанной в работах Хааг с соавт. [21] и Форд и Эванс [22] соответственно.

Скорость выделения кислорода при стационарном освещении (1000 мкмоль фотонов м⁻¹ с⁻¹) измерялось при 25° с помощью электрода Кларка

в среде, содержащей 25 мМ MES-NaOH (pH 6,5), 15 мМ NaCl, 10 мМ CaCl₂, 1 мМ K₃[Fe(CN)₆] и 0,1 мМ 2,6-дихлоро-*n*-бензохинона.

Кинетику индукции флуоресценции образцов измеряли при помощи флуориметра FL-300 («Photon Systems Instruments», Чехия). Стационарное освещение образцов осуществлялось при 625 нм. Интенсивность света на поверхности кюветы составляла 2000 мкмоль фотонов м⁻¹ с⁻¹.

Для регистрации кинетики спада флуоресценции хлорофилла в ответ на насыщающие вспышки света измерительный и действующий световые импульсы генерировались с помощью диодов с излучением в красной области спектра. Длительность вспышки составляла 10 мкс. Среда инкубации содержала 25 мМ MES-NaOH (pH 6,5), 15 мМ NaCl, 10 мМ CaCl₂ в отсутствие и в присутствии 1 М трегалозы. Все образцы предварительно инкубировались в темноте в течение 5 мин перед измерением.

Степень деградации белка определялась по содержанию осадка.

Кинетический анализ сигналов проводили при помощи программы Origin Program Package («OriginLab Corporation», США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 показана активность комплекса окисления воды ФС2 в стационарных условиях в присутствии трегалозы. Скорость выделения кислорода в ядерных комплексах ФС2 увеличивалась от 825 (в контрольных образцах) до 2060 мкмоль O₂(мг Хл ч)⁻¹ в присутствии 1 М трегалозы (рис. 1, а). В случае мембранных фрагментов, обогащенных комплексами ФС2, при добавлении трегалозы наблюдалось увеличение скорости выделения кислорода от 740 до 1340 мкмоль O₂(мг Хл ч)⁻¹ (рис. 1, б).

После 2 мин освещения ядерных комплексов ФС2 в отсутствие трегалозы скорость выделения кислорода уменьшалась на ~35% по сравнению с исходной (рис. 1, а, кривая 1). При добавлении трегалозы уменьшение скорости выделения кислорода было менее выраженным и составляло ~10% (0,5 М трегалоза, кривая 2) и 7,5% (1 М трегалоза, кривая 3) соответственно. Аналогичный анализ кинетики скорости выделения кислорода в случае мембранных фрагментов ФС2 в отсутствие трегалозы (рис. 1, б, кривая 1) показал, что скорость выделения кислорода после 2 мин освещения образцов снижалась на ~15% по сравнению с начальной. Добавление 0,5 М трегалозы приводило к уменьшению скорости выделения кислорода всего на ~5% (рис. 1, б, кривая 2), а в присутствии 1 М

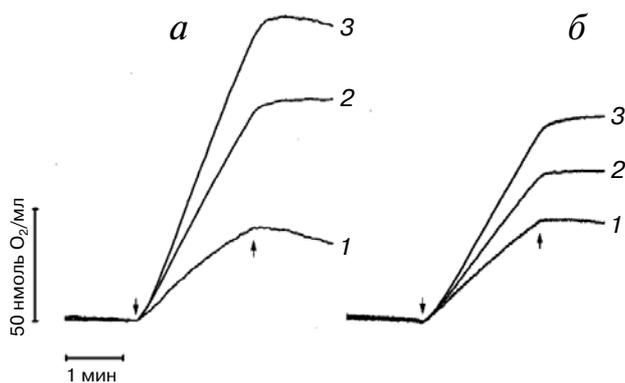


Рис. 1. Влияние трегалозы на скорости выделения кислорода в ядерных комплексах ФС2 (а) и мембранных фрагментах ФС2 (б) в среде, содержащей 25 мМ Mes (рН 6,5), 15 мМ NaCl, 10 мМ CaCl₂, в отсутствие (1) или в присутствии 0,5 М (2) или 1 М (3) трегалозы. K₃[Fe(CN)₆] (1 мМ) и 2,6-дихлоро-*n*-бензохинон (0,1 мМ) были использованы в качестве акцепторов электронов. Концентрация хлорофилла в образцах составляла 2 мкг мл⁻¹. Скорость выделения кислорода (мкмоль O₂ (мг Хл ч)⁻¹) составляла в ядерных комплексах ФС2: (1) 825, (2) 1500, (3) 2060; в мембранных фрагментах ФС2: (1) 740, (2) 1030, (3) 1340. Стрелками, направленными вниз и вверх, отмечено включение и выключение света ($\lambda = 650$ нм, 1000 мкмоль фотонов с⁻¹ м⁻²) соответственно

трегалозы уменьшения скорости практически не наблюдалось (кривая 3).

Полученные данные указывают на то, что трегалоза стабилизирует комплекс окисления воды. Следует отметить, что дальнейшее увеличение концентрации трегалозы было невозможно из-за ограниченной растворимости при комнатной температуре [23].

Для дальнейших исследований использовались только ядерные комплексы ФС2. Эти очищенные комплексы способны осуществлять перенос электронов от воды к терминальному хинонному акцептору, а также выделять кислород. Следует отметить, что скорость выделения O₂ в значительной степени уменьшилась (~75% ингибирования) в присутствии 5 мкМ 3-(3,4-дихлорофенил)-1,1-диметилмочевины (ДХММ) (данные не приведены).

Индукция флуоресценции в интактных ядерных комплексах ФС2, так же как и в случае мембранных фрагментов ФС2 [24–28], характеризуется двухфазной (ОJ и JP) кинетикой. Начальная (фотохимическая) фаза ОJ отражает восстановление первичного хинонного акцептора Q_A, тогда как кинетика и амплитуда фазы JP являются мерой скорости и степени восстановления терминального пластохинона Q_B на акцепторной стороне ФС2.

Рис. 2 демонстрирует кинетики индукции флуоресценции в адаптированных к темноте ядерных комплексах ФС2 в отсутствие (кривая 1) и в присутствии (кривая 2) 1,0 М трегалозы. Добавление этого дисахарида приводило к увеличению амплитуды JP-фазы, что связано с увеличением количества РЦ ФС2, способных восстанавливать терминальный хинонный акцептор.

Мы исследовали также влияние трегалозы на стабильность переноса электрона в комплексах ФС2. Рис. 2 показывает, что 30-дневное хранение ФС2 при 4° приводит к снижению амплитуды фазы ОJ в ~2,3 раза и еще более значительному (в ~6 раз) уменьшению фазы JP (соотношение амплитуд фаз JP/OJ уменьшается в ~2,5 раза (кривые 1 и 3). Уменьшение амплитуды ОJ-фазы связано с уменьшением числа центров, способных к восстановлению Q_A в результате инактивации белка. Более выраженное снижение амплитуды JP-фазы указывает, на первый взгляд, на то, что акцепторная сторона комплекса ФС2 является более чувствительной к хранению, чем донорная сторона. Однако одинаковое уменьшение амплитуды фазы ОJ и отношения амплитуд JP/OJ означает, что последний параметр непосредственно коррелирует с количеством центров с функционально-активными КОВ.

Хранение комплексов ФС2 в присутствии трегалозы при 4° в течение 30 дней привело к

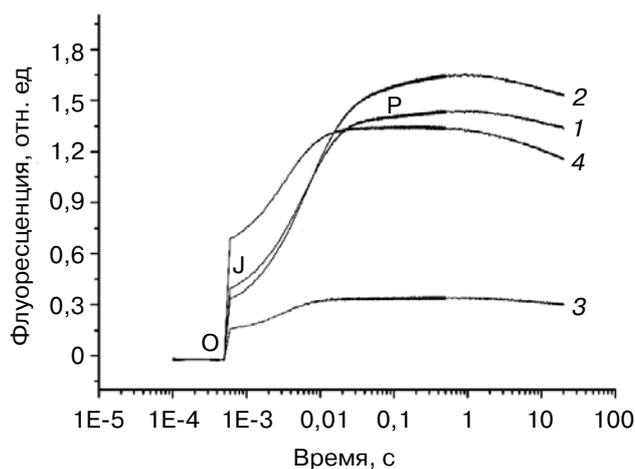


Рис. 2. Кинетика индукции флуоресценции в ядерных комплексах ФС2 в отсутствие (1) и в присутствии (2) 1 М трегалозы. Хранение адаптированных к темноте образцов в течение 30 дней при 4° в отсутствие (3) и в присутствии (4) 1 М трегалозы. Образцы в кювете емкостью 2 мл освещались постоянным светом при 625 нм. Интенсивность света на поверхности кюветы – 2000 мкмоль фотонов м⁻² с⁻¹. Концентрация хлорофилла в образцах – 10 мкг мл⁻¹. Среда измерения – как на рис. 1

значительному увеличению амплитуды как ОJ-, так и JP-фаз (4-кратному и 3,7-кратному соответственно) по сравнению с образцами в отсутствие трегалозы, хранимыми в тех же условиях (ср. кривые 3 и 4). Следует отметить, что в присутствии трегалозы в этих условиях не наблюдалась деградация белков (не показано). Однако соотношение JP/OJ оставалось почти одинаковым в отсутствие и в присутствии трегалозы (уменьшилось менее чем на 10%). Этот результат показывает, что трегалоза в одинаковой степени предохраняет перенос электрона от повреждения на донорной и акцепторной сторонах комплексов ФС2. Отметим также, что двукратное увеличение амплитуды ОJ-фазы после 30-дневного хранения образцов в присутствии трегалозы (кривая 4) по сравнению с контролем (ответ после 5 мин темновой адаптации в отсутствие трегалозы) (кривая 1) означает, что доля РЦ ФС2, способных восстанавливать Q_A , после хранения увеличивается. На самом деле инактивация комплексов ФС2 при длительном хранении приводит к экстракции ионов Mn из сайта связывания в белке и соответствующему сдвигу редокс-потенциала Q_A/Q_A^- от низко- к высокопотенциальной форме [29]. Последнее в свою очередь приводит к уменьшению константы равновесия переноса электрона от Q_A^- на Q_B . Тем не менее хранение образцов в течение 30 дней в присутствии трегалозы сохраняло кислород-выделяющую активность только в ~20% центров по сравнению с контрольными образцами. С другой стороны, в дополнение к стабилизирующей роли трегалозы на уровне КОВ механизм ее действия может также включать в себя непосредственную защиту и/или стабилизацию самого РЦ. Сохранение аналогичного соотношения JP/OJ предполагает, что степень окисления Q_A^- вторичным хиноном Q_B зависит в основном от количества функционально активных РЦ. Таким образом, можно считать, что хранение ФС2 в присутствии трегалозы частично предотвращает инактивацию, но в основном стабилизирует структуру самого РЦ. Ранее было показано, что добавление глицинбетаина к выделенному комплексу РЦ (D1/D2/Cytb₅₅₉) сохраняет его способность восстанавливать Cytb₅₅₉ феофитином и реокислять Cytb₅₅₉ первичным донором P680⁺, т.е. циклический перенос электронов вокруг ФС2 при фото- и термоиндуцированной инактивации [30]. Мы предполагаем подобный механизм и для стабилизации ядерных комплексов ФС2 при хранении в присутствии трегалозы.

Редокс-реакции с участием хинонных акцепторов в ФС2 чаще всего исследуются путем регистрации кинетики спада флуоресценции в

ответ на единичные вспышки света [31–37]. В образцах, адаптированных к темноте, восстановление первичного хинонного акцептора Q_A после первой вспышки приводит к увеличению флуоресценции ФС2, спад которой отражает реокисление Q_A^- [34–37]. В настоящей работе мы регистрировали реокисление Q_A^- для выявления кинетики переноса электрона от Q_A^- к вторичному хинонному акцептору Q_B в отсутствие (рис. 3, кривая 1) и в присутствии 1 М трегалозы (кривая 2). В комплексах ФС2 Q_A^- может окисляться двумя путями: за счет прямого переноса электронов на Q_B и в результате рекомбинации электрона с окисленными компонентами на донорной стороне фермента.

Отметим, что рекомбинация электрона между Q_A^- и S-состояниями КОВ или редокс-активным тирозином Y_Z (в лишенных Mn образцах) происходит гораздо медленнее (>50 мс), чем прямой перенос электрона [5]. Установлено, что кинетика прямого переноса электрона от Q_A на Q_B характеризуется, по меньшей мере, двумя экспоненциальными компонентами с характерными временами 0,2–0,8 и 2–3 мс [4, 31–34]. Кроме того, кинетика этой стадии переноса электрона зависит от нескольких факторов, в частности от pH, обезвоживания и температуры [38]. В ядерных комплексах ФС2 спад флуоресценции, индуцированный вспышкой, являлся мультикомпонентным (таблица). Кинетика хорошо аппроксимировалась тремя компонента-

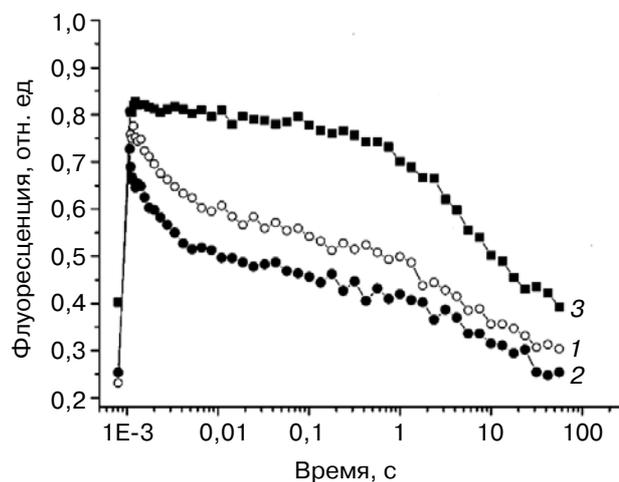


Рис. 3. Влияние трегалозы на кинетику реокисления Q_A^- в ответ на одиночную насыщающую вспышку в адаптированных к темноте ядерных комплексах ФС2. Спад флуоресценции в отсутствие (1) и в присутствии (2) 1 М трегалозы; в отсутствие трегалозы, но в присутствии 5 мкМ ДХММ (3). Среда измерения – как на рис. 1, др. условия см. в разделе «Методы исследования»

Кинетические параметры реакции реокисления Q_A^- после одиночной вспышки в ядерных комплексах ФС2

| Условия эксперимента | τ_1 , мс | τ_2 , мс | τ_3 , с | τ_4 , с |
|----------------------|---------------------------------|------------------------------|------------------------|---------------|
| Без добавки | $1,6 \pm 0,07$ (52% \pm 3) | 67 ± 5 (13% \pm 2) | $5,5$ (35% \pm 2) | |
| + 1 М трегалоза | $1,4 \pm 0,1$ (64% \pm 3) | 110 ± 3 (13% \pm 4) | 10 (23% \pm 3) | |
| – трегалоза | | | 2 | 12 |
| + 5 мкМ ДХММ | | | (33% \pm 3) | (67% \pm 2) |
| + 1 М трегалоза | | | $1,5$ | 12 |
| + 5 мкМ ДХММ | | | $40\% \pm 5$ | (60% \pm 3) |

Примечание. Указанные в скобках проценты отражают относительный вклад кинетических компонент в суммарный спад флуоресценции.

ми с характерными временами (τ): $\tau_1 \sim 1,6$ мс (относительный вклад $\sim 52\%$), $\tau_2 \sim 67$ мс ($\sim 13\%$) и $\tau_3 \sim 5,5$ с ($\sim 35\%$). Быстрая фаза отражает окисление Q_A^- терминальным акцептором Q_B , а остальные две медленные кинетические фазы могут быть отнесены к обратному переносу электрона от Q_A^- . Компонента с характерным временем 67 мс, вероятно, представляет собой долю РЦ ФС2, в которой отсутствует функциональный Mn_4CaO_5 -кластер, и в которой электрон рекомбинирует с Q_A^- на окисленный редокс-активный тирозин Y_Z [36, 37]. Более медленная кинетическая фаза (τ_3), вероятно, обусловлена рекомбинацией электрона между Q_A^- и положительно заряженными S-состояниями КОВ, в которых реакционные центры не в состоянии осуществлять прямой перенос электронов.

В присутствии трегалозы индуцированный вспышкой спад флуоресценции также аппроксимировался тремя кинетическими фазами: $\tau_1 \sim 1,4$ мс (относительный вклад $\sim 64\%$), $\tau_2 \sim 110$ мс ($\sim 13\%$) и $\tau_3 \sim 10$ с ($\sim 23\%$) (таблица). Результаты, полученные в отсутствие (рис. 3, кривая 1) и в присутствии трегалозы (кривая 2), демонстрируют, что различия характерных времен этих кинетических фаз незначительны. Основным эффектом трегалозы обусловлен $\sim 12\%$ -ным увеличением относительного вклада быстрой компоненты (τ_1), соответствующей прямому переносу электронов от Q_A^- за счет самой медленной компоненты (τ_3). Эта компонента, по-видимому, соответствует реакции рекомбинации электрона между Q_A^- и S_2 -состояниями кластера Mn_4CaO_5 . Полученные данные позволяют предположить, что трегалоза стимулирует прямой перенос электрона от Q_A^- .

Регистрация кинетики спада флуоресценции в ответ на вспышку в присутствии ДХММ позволяет выявить перенос электронов на донорной стороне ФС2 [36, 37, 39]. ДХММ связывается сайтом Q_B и ингибирует прямой перенос электрона от Q_A^- . В этих условиях кинетика рекомбинации между Q_A^- и положительно заряженными компонентами на донорной стороне (после единичной вспышки основным состоянием КОВ является S_2) отражает целостность цепи переноса электронов на окислительной стороне ФС2 [36, 37]. В таких условиях быстрая фаза, соответствующая прямой реакции реокисления Q_A^- , не наблюдалась, и кинетика аппроксимировалась медленными компонентами в секундном временном диапазоне (рис. 3, кривая 3). Причина отсутствия промежуточной фазы (τ_2) в присутствии ингибитора (таблица) неясна. Фаза с $\tau_3 \sim 2$ с ($\sim 33\%$), вероятно, обусловлена рекомбинацией электрона между Q_A^- и частично восстановленными Mn-центрами, в то время как очень медленная фаза (~ 12 с, $\sim 67\%$), вероятно, соответствует рекомбинации в РЦ ФС2, находящихся в S_0 -состоянии перед вспышкой [40, 41]. Отметим, что добавление трегалозы практически не приводит к изменению характерных времен и относительных вкладов фаз спада флуоресценции в присутствии ДХММ (таблица), отражающих рекомбинацию электрона между Q_A^- и компонентами на окислительной стороне ФС2.

Механизм влияния трегалозы на комплекс ФС2 не вполне ясен. Известно, что для оптимального функционирования белков молекулы воды, принадлежащие гидратационной оболочке белка,

объемному растворителю или локализованные внутри белка, играют существенную роль [10, 20]. Результаты, полученные при крайне низкой степени гидратации в бактериальных РЦ, дают основания предполагать, что ограниченное число прочно связанных молекул воды стабилизирует светоиндуцированные состояния разделения зарядов на временной шкале 10^{-2} с [42].

Таким образом, в настоящей работе нами было показано, что добавление трегалозы значительно стимулирует стационарную скорость выделения O_2 как в мембранных фрагментах, так и в ядерных комплексах ФС2. Путем анализа начальных скоростей выделения кислорода выявлено, что трегалоза стимулирует комплекс окисления воды, и эти данные хорошо согласуются с результатами, полученными в работе Поландер и Бэрри [43] по ФТИР-спектроскопии на выделенных комплексах ФС2.

Как и в случае сахарозы и глицерина [35] трегалоза не влияет на кинетику реакции реокисления Q_A^- , хотя увеличивает относительную долю РЦ ФС2, способных окислять Q_A^- . Как уже было отмечено выше, трегалоза также предотвращает агрегацию и инактивацию при длительном хранении образцов ФС2, вероятно, в результате стабилизации реакционного центра. Предположено, что в присутствии трегалозы в результате изменения гидратации комплекс ФС2 переходит в конформацию, более оптимальную для эффективного функционирования.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты 14-04-00519, 12-04-00821, НК-13-04-40299-Н) и Президента РФ (грант НШ-4771.2014.4). Результаты, представленные на рис. 3, были получены при поддержке РНФ (грант 14-14-00789).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Goussias, C., Boussac, A., and Rutherford, A.W. (2002) Photosystem II and photosynthetic oxidation of water: an overview, *Philos. Trans. R. Soc. London, B: Biol. Sci.*, **357**, 1369–1381.
- Wydrzynski, T.J., and Satoh, K. (2005) Photosystem II: the light-driven water: plastoquinone oxidoreductase, in *Advances in photosynthesis and respiration*, Springer, N.Y.
- Kok, B., Forbush, B., and McGloin, M. (1970) Cooperation of charges in photosynthetic O_2 evolution – I. A linear four step mechanism, *Photochem. Photobiol.*, **11**, 467–475.
- Shinkarev, V.P. (2004) Photosystem II: oxygen evolution and chlorophyll a fluorescence induced by multiple flashes, in *Chlorophyll a fluorescence: a signature of photosynthesis. Advances in photosynthesis and respiration* (Papageorgiou, G.C., and Govindjee, eds), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 197–229.
- Renger, G., and Kuhn, P. (2007) Reaction pattern and mechanism of light induced oxidative water splitting in photosynthesis, *Biochim. Biophys. Acta*, **1767**, 458–471.
- Dau, H., and Haumann, M. (2007) Eight steps preceding O–O bond formation in oxygenic photosynthesis – a basic reaction cycle of the Photosystem II manganese complex, *Biochim. Biophys. Acta*, **1767**, 472–483.
- Barber, J. (2008) Photosynthetic generation of oxygen, *Philos. Trans. R. Soc. London, B: Biol. Sci.*, **363**, 2665–2674.
- Crowe, J.H., Crowe, L.M., and Jackson, S.A. (1983) Preservation of structural and functional activity in lyophilized sarcoplasmic reticulum, *Arch. Biochem. Biophys.*, **220**, 477–484.
- Sun, W.Q., and Davidson, P. (1998) Protein inactivation in amorphous sucrose and trehalose matrices: effects of phase separation and crystallization, *Biochim. Biophys. Acta*, **1425**, 235–244.
- Francia, F., Dezi, M., Mallardi, A., Palazzo, G., Cordone, L., and Venturoli, G. (2008) Protein-matrix coupling/uncoupling in «dry» systems of photosynthetic reaction center embedded in trehalose/sucrose: the origin of trehalose peculiarity, *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 10240–10246.
- Jain, N.K., and Roy, I. (2009) Effect of trehalose on protein structure, *Prot. Sci.*, **18**, 24–36.
- Allakhverdiev, S.I., Los, D.A., Mohanty, P., Nishiyama, Y., and Murata, N. (2007) Glycinebetaine alleviates the inhibitory effect of moderate heat stress on the repair of photosystem II during photoinhibition, *Biochim. Biophys. Acta*, **1767**, 1363–1371.
- Chen, T.H., and Murata, N. (2011) Glycinebetaine protects plants against abiotic stress: mechanisms and biotechnological applications, *Plant Cell Environ.*, **34**, 1–20.
- Fernandez, O., Bethencourt, L., Quero, A., Sangwan, R.S., and Clement, C. (2010) Trehalose and plant stress responses: friend or foe, *Trend Plant Sci.*, **15**, 409–417.
- Ohtake, S., and Wang, Y.J. (2011) Trehalose: current use and future applications, *J. Pharm. Sci.*, **100**, 2020–2053.
- Jun, S.-S., Choi, H.J., Lee, H.Y., and Hong, Y.-N. (2008) Altered physiology in trehalose-producing transgenic tobacco plants: enhanced tolerance to drought and salinity stresses, *J. Plant Biol.*, **51**, 327–336.
- Garg, A.K., Kim, J.-K., Owens, T.G., Ranwala, A.P., Choi, Y.D., Kochian, L.V., and Wu, R.J. (2002) Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 15898–15903.
- Hincha, D.K., Hofner, R., Schwab, K.B., Heber, U., and Schmitt, J.M. (1987) Membrane rupture is the common cause of damage to chloroplast membranes in leaves injured by freezing or excessive wilting, *Plant Physiol.*, **83**, 251–253.
- Apostolova, E., Bushova, M., and Tenchov, B. (2005) Freezing damage and protective of photosystem 2 by sucrose and trehalose, in *Research photosynthesis* (Murata, N., ed.), Kluwer Academic Publishers, IV, pp. 165–168.
- Francia, E., Malferrari, M., Sacquin-Mora, S., and Venturoli, G. (2009) Charge recombination kinetics and protein dynamics in wild type and carotenoid-less bacterial reaction centers: studies in trehalose glasses, *J. Phys. Chem.*, **113**, 10389–10398.
- Haag, E., Irrgang, K.D., Boekema, E.J., and Renger, G. (1990) Functional and structural analysis of photosystem II core complexes from spinach with high oxygen evolution capacity, *Eur. J. Biochem.*, **189**, 47–53.

22. Ford, R.C., and Evans, M.C.W. (1983) Isolation of a photosystem 2 preparation from higher plants with highly enriched oxygen evolution activity, *FEBS Lett.*, **160**, 159–164.
23. Lebrét, A., Bordat, P., Affouard, F., Descamps, M., and Migliardo, F. (2005) How homogeneous are the trehalose, maltose, and sucrose water solutions? An insight from molecular dynamics simulations, *J. Phys. Chem. B.*, **109**, 11046–11057.
24. Govindjee (1995) Sixty-three years since Kautsky: chlorophyll a fluorescence, *Aust. J. Plant Physiol.*, **22**, 131–160.
25. Pospisil, P., and Dau, H. (2000) Chlorophyll fluorescence transients of Photosystem II membrane particles as a tool for studying photosynthetic oxygen evolution, *Photosyn. Res.*, **65**, 41–52.
26. Bukhov, N.G., Egorova, E.A., Govindacharya, S., and Carpentier, R. (2004) Changes in polyphasic chlorophyll a fluorescence induction curve upon inhibition of donor or acceptor side of photosystem II in isolated thylakoids, *Biochim. Biophys. Acta*, **1657**, 121–130.
27. Zhu, X.-G., Govindjee, Baker, N.R., deSturler, E., Ort, D.R., and Long, S.P. (2005) Chlorophyll a fluorescence induction kinetics in leaves predicted from a model describing each discrete step of excitation energy and electron transfer associated with Photosystem II, *Planta*, **223**, 114–133.
28. Petrova, I.O., Kurashov, V.N., Semenov, A.Yu., and Mamedov, M.D. (2011) Manganese-depleted/reconstituted photosystem II core complexes in solution and liposomes, *J. Photochem. Photobiol. B*, **104**, 372–376.
29. Krieger, A., Rutherford, A.W., and Johnson, G.N. (1995) On the determination of redox midpoint potential of the primary quinone electron acceptor, Q_A, in Photosystem II, *Biochim. Biophys. Acta*, **1229**, 193–201.
30. Allakhverdiev, S.I., Hayashi, H., Nishiyama, Y., Ivanov, A.G., Aliev, J.A., Klimov, V.V., Murata, N., and Carpentier, R. (2003) Glycinebetaine protects the D1/D2/Cytb559 complex of photosystem II against photo-induced and heat-induced inactivation, *J. Plant Physiol.*, **160**, 41–49.
31. Bowes, J.M., and Crofts, A.R. (1980) Binary oscillations in the rate of reoxidation of the primary acceptor of photosystem II, *Biochim. Biophys. Acta*, **590**, 373–384.
32. Eaton-Rye, J.J., and Govindjee (1988) Electron-transfer through the quinone acceptor complex of Photosystem II after one or two actinic flashes in bicarbonate-depleted spinach thylakoid membranes, *Biochim. Biophys. Acta*, **935**, 248–257.
33. de Wijn, R., and van Gorkom, H.J. (2001) Kinetics of electron transfer from Q(a) to Q(b) in photosystem II, *Biochemistry*, **40**, 11912–11922.
34. Rova, M., Mamedov, F., Magnuson, A., Fredriksson, P.-O., and Styring, S. (1998) Coupled activation of the donor and the acceptor side of photosystem II during photoactivation of the oxygen evolving cluster, *Biochemistry*, **37**, 11039–11045.
35. Halverson, K.M., and Barry, B.A. (2003) Sucrose and glycerol effects on photosystem II, *Biophys. J.*, **85**, 1317–1325.
36. Sigfridsson, K.G.V., Bernat, G., Mamedov, F., and Styring, S. (2004) Molecular interference of Cd²⁺ with Photosystem II, *Biochim. Biophys. Acta*, **1659**, 19–31.
37. Roose, J.L., Frankel, L.K., and Bricker, T.M. (2010) Documentation of significant electron transport defects on the reducing side of photosystem II upon removal of the PsbP and PsbQ extrinsic proteins, *Biochemistry*, **49**, 36–41.
38. Muh, F., Glockner, C., Hellmich, J., and Zouni, A. (2012) Light-induced quinone reduction in photosystem II, *Biochim. Biophys. Acta*, **1817**, 44–65.
39. Renger, G. (1999) Molecular mechanism of water oxidation, in *Concepts in photobiology: photosynthesis and photomorphogenesis* (Singhal, G.S., Renger, G., Govindjee, Irrgang, K.-D., and Sopory, S.K., eds), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Narosa Publishing Co., Delhi, pp. 292–329.
40. Rappaport, F., Guergova-Kuras, M., Nixon, P.J., Diner, B.A., and Lavergne, J. (2002) Kinetics and pathways of charge recombination in Photosystem II, *Biochemistry*, **41**, 8518–8527.
41. Mamedov, F., Rintamaki, E., Aro, E.-M., Andersson, B., and Styring, S. (2002) Influence of protein phosphorylation on the electron-transport properties of Photosystem II, *Photosyn. Res.*, **74**, 61–72.
42. Malferrari, M., Francia, F., and Venturoli, G. (2011) Coupling between electron transfer and protein-solvent dynamics: FTIR and laser-flash spectroscopy studies in photosynthetic reaction center films at different hydration levels, *J. Phys. Chem.*, **115**, 14732–14750.
43. Polander, P.C., and Barry, B.A. (2012) A hydrogen-bonding network plays a catalytic role in photosynthetic oxygen evolution, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 6112–6117.

EFFECT OF TREHALOSE ON OXYGEN EVOLUTION AND ELECTRON TRANSFER IN PHOTOSYSTEM 2 COMPLEXES

M. D. Mamedov^{1,2*}, I. O. Petrova¹, D. V. Yanykin²,
A. A. Zaspа¹, A. Yu. Semenov^{1,3}

¹ M. V. Lomonosov Moscow State University, A. N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow 119991, Russia; fax: +7(495)939-3181, E-mail: mahirmamedov@yandex.ru

² Institute of Basic Biological Problems, Russian Academy of Sciences, Pushchino 142290, Moscow Region, Russia; fax: +7(496)733-0532, E-mail: ya-d-ozh@rambler.ru

³ N. N. Semenov Institute of Chemical Physics, Moscow 119991, Russia; fax: +7(495)651-2191, E-mail: semenov@genebee.msu.ru

Received July 14, 2014

Revision received September 02, 2014

Pigment–protein complex of photosystem 2 (PS2) catalyzes the light-driven oxidation of water molecules and the reduction of plastoquinone. In this work, we studied the effect of the disaccharide trehalose, which is unique in its physicochemical properties, on isolated PS2 complex. It was found that trehalose significantly stimulates the steady-state rate of oxygen evolution. The study of single flash-induced fluorescence decay kinetics demonstrated that trehalose did not affect the rate of Q_A^- oxidation, although it led to an increase in the relative fractions of PS2 reaction centers capable of Q_A^- oxidation. Trehalose also protected PS2 complexes against inactivation under long-term storage. The latter is probably due to stabilization of the reaction center complex. It is proposed that in the presence of trehalose, which affects the extent of hydration, the protein may preferentially exist in a more optimal conformation for effective functioning.

Key words: photosystem 2, water-oxidizing complex, oxygen evolution, trehalose, chlorophyll fluorescence, plastoquinone oxidation