

ЗАВИСИМОСТЬ ОТ ТЕМПЕРАТУРЫ ФОТОИНДУЦИРОВАННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ПОГЛОЩЕНИЯ, СВЯЗАННЫХ С ФОТООКИСЛЕНИЕМ ХЛОРОФИЛЛА В БЕЗМАРГАНЦЕВЫХ КОМПЛЕКСАХ ЯДРА ФОТОСИСТЕМЫ 2*

© 2015 А.А. Забелин^{1**}, В.А. Шкуропатова¹,
А.Я. Шкуропатов¹, В.А. Шувалов^{1,2}

¹ Институт фундаментальных проблем биологии РАН, 142290 Пущино
Московской обл., ул. Институтская, 2; факс: +7(4967)33-0532,
электронная почта: zabelin.bio@gmail.com

² Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН,
119991 Москва, ул. Косыгина, 4; факс: +7(495)651-2191

Поступила в редакцию 15.05.15
После доработки 19.06.15

Изменения поглощения в средней инфракрасной области спектра (4500–1150 см⁻¹), индуцированные стационарным освещением безмарганцевых комплексов ядра фотосистемы 2 (ФС2) шпината в присутствии экзогенных акцепторов электрона (феррицианида калия и силикомолибдата), исследованы методом дифференциальной ИК-Фурье-спектроскопии в диапазоне температур 100–265 К. Разностный ИК-Фурье-спектр фотоокисления димера молекул хлорофилла P₆₈₀ выделен из набора сигналов, связанных с окислением вторичных доноров электрона (β-каротин, хлорофилл) и восстановлением первичного хинона Q_A. На основании температурной зависимости ИК-Фурье-спектра P₆₈₀⁺/P₆₈₀ сделано заключение, что частоты валентных мод 13¹-кето С=О групп нейтральных молекул хлорофилла P_{D1} и P_{D2}, составляющих P₆₈₀, близки друг другу, располагаясь при ~1700 см⁻¹. Этот факт в сочетании со значительным различием частот валентных мод кетогрупп катионов P_{D1}⁺ и P_{D2}⁺ (1724 и 1709 см⁻¹ соответственно) согласуется с литературной моделью (Окубо с соавт., *Biochemistry*, 2007), предполагающей преимущественную локализацию положительного заряда в димере P₆₈₀ на одной из двух молекул хлорофилла. Частичная делокализация заряда между молекулами P_{D1} и P_{D2} в P₆₈₀⁺ подтверждается присутствием характерной электронной полосы переноса заряда при ~3000 см⁻¹. Показано, что выцветающая полоса при 1680 см⁻¹ в ИК-Фурье-спектре P₆₈₀⁺/P₆₈₀ не принадлежит P₆₈₀. Возможное происхождение этой полосы обсуждается с учетом температурной зависимости (100–265 К) фотоиндуцированных изменений поглощения комплексов ядра ФС2 в видимой области спектра (620–720 нм).

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: комплекс ядра фотосистемы 2, ИК-Фурье-спектроскопия, хлорофилл, фотоокисление, катион-радикал.

Фотосистема 2 (ФС2) – трансмембранный пигмент-белковый комплекс, осуществляющий высокоэффективное фотохимическое разделение разноименных зарядов на начальных стадиях преобразования световой энергии в химическую энергию в высших растениях, водорослях и цианобактериях. Локализация положительного заряда, образующегося в реакции разделения за-

рядов в ФС2, на димере P₆₈₀ молекул хлорофилла *a* (Хл) составляет одну из ключевых стадий окислительного фотосинтеза, в результате которой генерируется сильный окислитель, катион-радикал P₆₈₀⁺, требуемый для окисления воды до молекулярного кислорода. В связи с этим большой интерес представляют исследования электронных свойств P₆₈₀⁺ и оценка распределения из-

Принятые сокращения: ΔA – изменение поглощения; Кар – β-каротин; РЦ – реакционный центр; Фео – феофитин *a*; Фео_{D1} – феофитин *a*, связанный с полипептидом D1 реакционного центра; ФС2 – фотосистема 2; Хл – хлорофилл *a*; Хл_{D1} и Хл_{D2} – мономерные хлорофиллы, связанные с полипептидами D1 и D2 реакционного центра; Хл_Z – редокс-активный дополнительный хлорофилл реакционного центра; цит *b559* – цитохром *b559*; P₆₈₀ – димер молекул Хл в реакционном центре ФС2; P_{D1}, P_{D2} – молекулы хлорофилла, составляющие P₆₈₀; Q_A – первичный хиноновый акцептор; SiMo – силикомолибдат.

* Первоначально английский вариант рукописи был опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow), Papers in Press, VM15-150, 23.08.2015.

** Адресат для корреспонденции.

быточного положительного заряда между двумя его половинами (молекулами P_{D1} и P_{D2} [1–3]) – важного фактора, значительно влияющего на окислительно-восстановительный потенциал пары P_{680}^+/P_{680} [4]. Информация такого рода может быть получена, в частности, из анализа величины высокочастотного сдвига 13^1 -кето $C=O$ валентной моды хлорофилла при его окислении [5–8], измеренного с помощью фотоиндуцированной дифференциальной инфракрасной спектроскопии с Фурье-преобразованием (ИК-Фурье-спектроскопия). Этот вид спектроскопии позволяет исследовать с очень высокой чувствительностью колебательные свойства, структуру и молекулярные взаимодействия кофакторов как в их основном, так и ион-радикальных состояниях [9, 10]. Ранее положительные сигналы при 1723–1725 и 1709–1711 cm^{-1} , соотносимые с 13^1 -кето $C=O$ группами катионов P_{D1}^+ и P_{D2}^+ , были выявлены в фотоиндуцированных разностных ИК-Фурье-спектрах P_{680}^+/P_{680} комплексов ядра ФС2 цианобактерий [8, 11] и мембран ФС2 высших растений [8]. Однако определенное соотношение кето $C=O$ мод нейтральных P_{D1} и P_{D2} не было достигнуто. Согласно данным Окубо с соавт. [8] 13^1 -кето $C=O$ группы молекул P_{D1} и P_{D2} имеют близкие колебательные частоты, и обеим группам может быть приписана выцветающая полоса, наблюдаемая в ИК-Фурье-спектре при ~ 1700 cm^{-1} . В то же время предполагается, что поглощению кетогруппы молекулы P_{D2} соответствует отрицательный сигнал, расположенный в области более низких частот ИК-Фурье-спектра (при 1681 cm^{-1}) [11].

С целью дальнейшей идентификации ИК-полос поглощения, отражающих специфические колебания P_{680} и P_{680}^+ , в настоящей работе исследована зависимость фотоиндуцированных разностных ИК-Фурье-спектров P_{680}^+/P_{680} (4500–1150 cm^{-1}) в комплексах ядра ФС2 высших растений от температуры в интервале 100–265 К. Фотоиндуцированные разностные спектры фотоокисления P_{680} измерены в том же температурном интервале также в видимой спектральной области (620–720 нм).

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Кислород-выделяющие комплексы ядра ФС2, содержащие ~ 35 молекул Хл на РЦ, были выделены из мембранных фрагментов ФС2 шпината [12] согласно методу ван Лиувен с соавт. [13]. Хроматографически очищенные препараты комплексов ядра были суспендированы в буфере BTS400, содержавшем 20 мМ Bis-Tris (рН 6,5), 20 мМ $MgCl_2$, 5 мМ $CaCl_2$, 75 мМ $MgSO_4$,

400 мМ сахарозы и 0,03% (m/V) *n*-додецил- β -D-мальтозида. Комплексы включали фотовосстанавливаемый первичный хинонный акцептор Q_A , но не содержали функциональный вторичный хинон Q_B [13, 14]. Редокс-активный β -каротин (Кар) присутствовал в комплексах [15]. Цит *b559* был полностью окислен в этих препаратах [13, 14]. Комплексы ядра ФС2, лишенные марганца, были получены инкубацией исходных комплексов с NH_2OH (3 мМ) и Na_2EDTA (3 мМ) в BTS400 в течение 15 мин в темноте с последующей хроматографической очисткой на колонке с Q-сефарозой (FF). Все процедуры, связанные с выделением комплексов ядра, удалением марганца и подготовкой образцов для спектральных измерений, были выполнены при 5° на слабом зеленом свете. Концентрирование комплексов проводили на мембране 30 кДа («Millipore», США) в ячейке для ультраконцентрирования под давлением газообразного аргона.

Скорость выделения кислорода измеряли электродом Кларка («Hansatech», Великобритания) при 24° на образцах, содержащих 10 мкМ Хл/мл, при освещении постоянным насыщающим красным светом ($\lambda > 600$ нм). Феррицианид калия (1 мМ) и 2,6-дихлор-1,4-бензохинон (0,25 мМ) были использованы в качестве искусственных акцепторов электрона. Типичные скорости выделения O_2 в исходных комплексах ядра ФС2 составляли ~ 1000 мкмоль O_2 (мг Хл) $^{-1}$ ч $^{-1}$; в безмарганцевых образцах выделения O_2 не наблюдалось. Концентрацию Хл в образцах определяли по методу Арнон [16].

Фотоиндуцированные изменения поглощения образцов в видимой и средней ИК-областях спектра были получены в присутствии феррицианида калия и силикомолибдата (SiMo) как экзогенных акцепторов электрона [8].

Образцы для измерений ИК-Фурье-спектров получали следующим образом. Аликвоту (6 мкл) суспензии безмарганцевых комплексов ядра ФС2 ($\sim 2,5$ мг Хл/мл) в буфере BTS400 наносили на подложку из CaF_2 и затем добавляли 1 мкл 100 мМ водного раствора феррицианида калия и (или) 0,6 мкл 6 мМ водного раствора SiMo. Полученную смесь слегка высушивали в потоке газообразного аргона и накрывали второй подложкой из CaF_2 .

ИК-Фурье-спектры поглощения записывали на инфракрасном вакуумируемом Фурье-спектрометре IFS66v/s («Bruker», Германия) с детектором МСТ и светоделителем из KBr. Спектральное разрешение составляло 4 cm^{-1} . Температуру образца контролировали в оптическом криостате с температурным контроллером («Specac», Великобритания). Образцы защищались от актиничного эффекта света He-Ne лазера спект-

рофотометра с помощью фильтра из германия. Другой германиевый фильтр был использован для защиты детектора от возбуждающего красного света. Обратимые фотоиндуцированные (свет–минус–релаксация) разностные спектры рассчитывали как разность ИК-Фурье-спектров (10 сканирований, время накопления ~4 с), измеренных под действием возбуждающего света ($\lambda > 600$ нм, ~15 мВт/см²) и через 10 с после релаксации образца в темноте. Циклы освещения повторяли сотни раз для улучшения соотношения сигнал/шум.

Спектры поглощения образцов в видимой спектральной области измеряли на спектрофотометре Agilent 8453 («Agilent», США) в самодельном оптическом криостате, используя кювету с длиной оптического пути ~2 мм. В этом случае к суспензии безмарганцевых комплексов ядра ФС2 (~100 мкг Хл/мл) добавляли растворы феррицианида калия и SiMo до конечной концентрации 3 мМ и 300 мкМ соответственно, и полученный образец смешивали с 60% глицерина (v/v). Обратимые фотоиндуцированные (свет–минус–релаксация) разностные спектры (620–720 нм) получали как разность между спектрами поглощения, измеренными под действием актиничного освещения в течение 7 с ($\lambda > 600$ нм, ~15 мВт/см²) и через 10 с после последующей релаксации образца в темноте. Циклы освещения повторяли от 4 до 16 раз для улучшения соотношения сигнал/шум.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Рис. 1, кривая 1 показывает фотоиндуцированный (свет–минус–релаксация) разностный ИК-Фурье-спектр безмарганцевых комплексов ядра ФС2, измеренный в присутствии смеси феррицианида калия и SiMo в области 1800–1150 см⁻¹ при 265 К. Сложный характер спектра указывает на образование более чем одной фотоиндуцированной ион-радикальной формы, релаксирующей в темноте на временной шкале наших измерений. Абсорбционные изменения, наблюдаемые в области валентных колебаний 13¹-кето С=О групп пигментов 1724–1700 см⁻¹, свидетельствуют о вкладе в разностный спектр 1 сигналов, отражающих окисление P₆₈₀ [8, 11]. Очевидно, однако, что спектр включает также изменения поглощения, связанные с восстановлением первичного хинона Q_A, как это доказывается присутствием положительной полосы при 1478 см⁻¹, ранее отнесенной к валентным колебаниям С=О групп семихинона Q_A⁻ [17, 18]. Ожидается поэтому, что разностный спектр 1 содержит также ИК-сигнал

при ~1724/1719 см⁻¹, вызванный электростатическим ответом 13³-эфирной С=О группы фотоактивного феофитина Фео_{D1} на образование Q_A⁻ [17, 19].

Рис. 1, кривая 2 показывает, что фотоиндуцированный (свет–минус–релаксация) разностный ИК-Фурье-спектр безмарганцевых комплексов ядра ФС2, измеренный при добавке в качестве экзогенного акцептора электрона только SiMo, значительно проще, чем разностный спектр 1, особенно в области валентных колебаний кетогрупп пигментов, а также в низкочастотной области (≤ 1420 см⁻¹). Судя по отчетливой положительной полосе при 1478 см⁻¹, разностный спектр 2 содержит преобладающий вклад от абсорбционных изменений, связанных с образованием Q_A⁻ [17, 18], в то время как сигналы от P₆₈₀⁺/P₆₈₀ практически отсутствуют.

Рис. 1, кривая 3 представляет двойной разностный спектр, полученный вычитанием разностного спектра 2 из разностного спектра 1 после их нормировки по амплитуде полосы Q_A⁻ при 1478 см⁻¹. Спектр 3 характеризуется набором специфических сигналов, отражающих фотоокисление P₆₈₀, и согласуется с фотоиндуцированными разностными P₆₈₀⁺/P₆₈₀ ИК-Фурье-спектрами комплексов ядра ФС2 цианобактерий при 265 К [8] и 250 К [11], а также мембран ФС2 из шпината при 265 К [8]. В области валентных колебаний кето-карбонильных групп молекул Хл в спектре 3 хорошо разрешены две маркерные положительные полосы при 1724 и 1709 см⁻¹, отнесенные 13¹-кето С=О валентным модам P_{D1}⁺ и P_{D2}⁺ соответственно, смещенным в высокочастотную область при образовании катиона [8, 11, 20]. Соответствующая интенсивная отрицательная полоса нейтрального P₆₈₀ расположена при 1700 см⁻¹. В то же время, в согласии с предшествующими данными [8, 11], имеется также другая выраженная отрицательная полоса, локализованная при 1680 см⁻¹. В частотной области скелетных колебаний хлориновых макроциклов (1600–1150 см⁻¹) в спектре 3 различим ряд положительных и отрицательных пиков, в т.ч. при 1311(+), 1170(+), 1346(-), 1286(-) и 1182(-) см⁻¹ («+» и «-» показывают знаки абсорбционных изменений), соотносимых, соответственно, с P₆₈₀⁺ и P₆₈₀ [8].

Дополнительным подтверждением того, что двойной разностный спектр 3 (рис. 1) отражает фотоокисление Хл в димере P₆₈₀, является наблюдение широкой положительной ИК-полосы с максимумом при ~3000 см⁻¹ (рис. 2, кривая 1), принадлежащей низкоэнергетическому электронному переходу, связанному с переносом положительного заряда («дырки») между двумя половинами димерного катион-радикала [21, 22].

Этот переход является уникальной характеристикой димерной структуры первичного донора электрона и свидетельствует о частичной делокализации заряда в P_{680}^+ [8, 21, 22]. Сигнал в области $\sim 3700\text{--}2900\text{ см}^{-1}$ (рис. 2) был насыщен из-за сильного поглощения воды и образца. Пики при 2113 и 2136 см^{-1} обусловлены восстановлением феррицианида до ферроцианида. Ранее аналогичная полоса при $\sim 3000\text{ см}^{-1}$ была обна-

ружена для комплексов ядра ФС2 цианобактерий и мембран ФС2 из шпината [8]. Отсутствие такой полосы в фотоиндуцированном ИК-Фурье-спектре комплексов ядра ФС2 с добавкой только SiMo (рис. 2, кривая 2) подтверждает, что сигналы от P_{680}^+/P_{680} не регистрируются в этом случае.

Нельзя исключить вероятность того, что в двойном разностном спектре 3 (рис. 1) могут

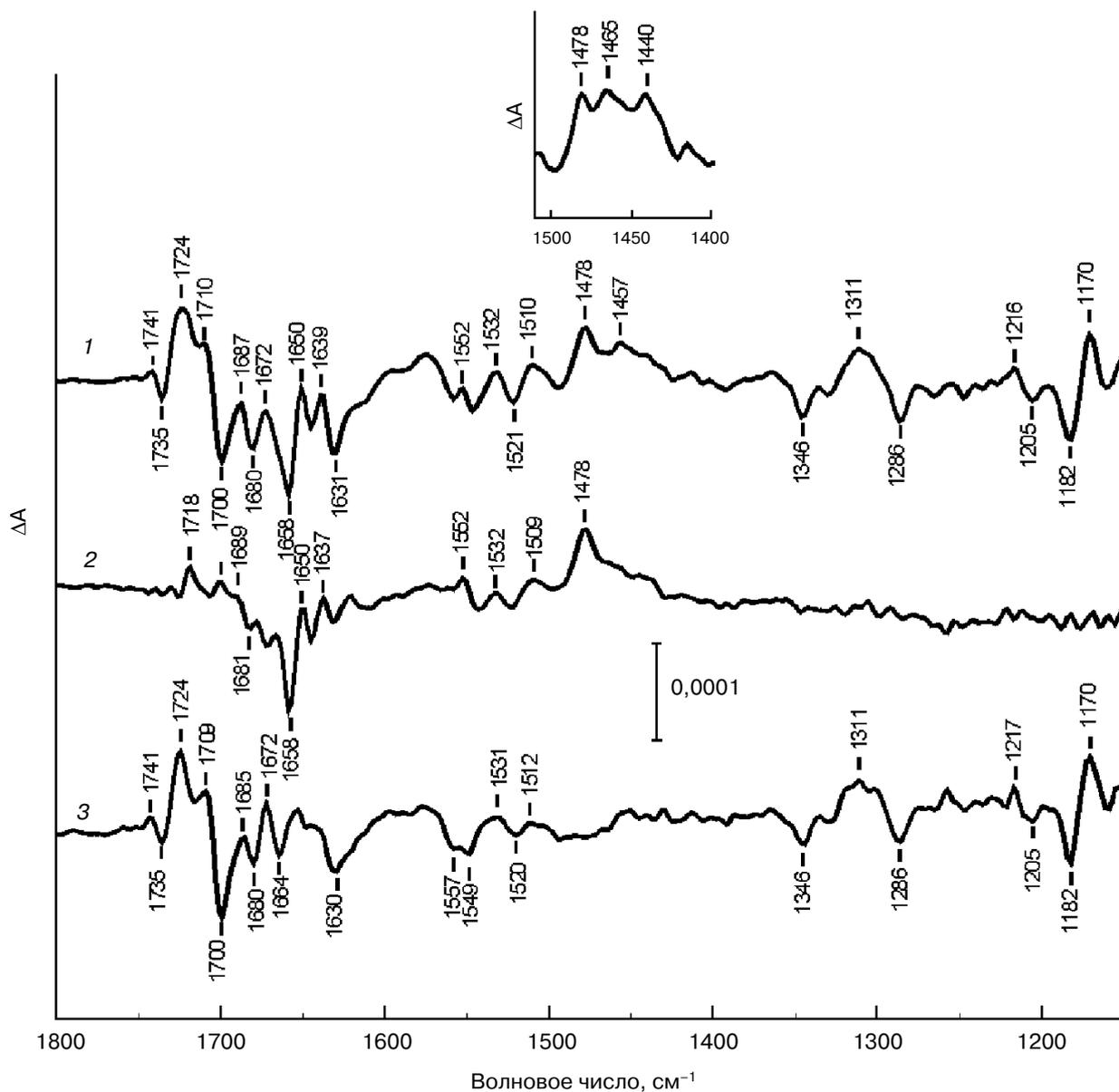


Рис. 1. Фотоиндуцированные (свет–минус–релаксация) разностные ИК-Фурье-спектры ($1800\text{--}1150\text{ см}^{-1}$) безмарганцевых комплексов ядра ФС2, измеренные в присутствии феррицианида калия и SiMo (1) и только SiMo (2) при 265 К . Спектр 2 нормирован к спектру 1 по амплитуде полосы при 1478 см^{-1} . 3 – Двойной разностный спектр P_{680}^+/P_{680} , полученный вычитанием спектра 2 из спектра 1. Вставка показывает фотоиндуцированный (свет–минус–релаксация) разностный ИК-Фурье-спектр безмарганцевых комплексов ядра ФС2, измеренный в присутствии феррицианида калия и SiMo в области валентных колебаний семихинона Q_A и катион-радикала каротиноида Car^+ при 100 К

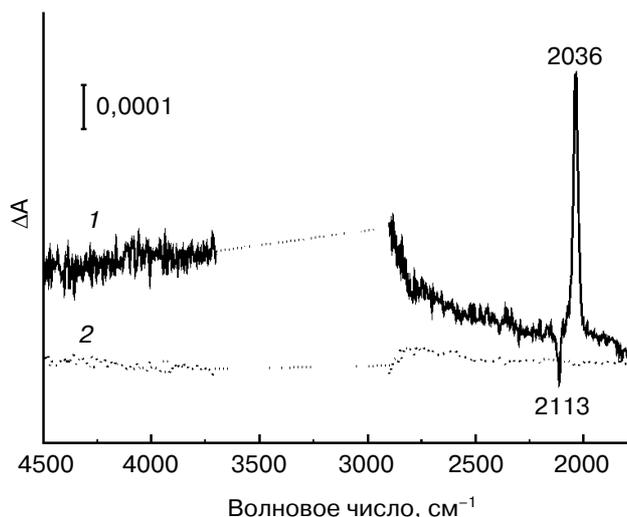


Рис. 2. Фотоиндуцированные (свет–минус–релаксация) ИК-Фурье-спектры безмарганцевых комплексов ядра ФС2, измеренные в диапазоне 4500–1800 см^{-1} при 265 К. Спектры 1 и 2 представляют, соответственно, высокочастотные области спектров 3 и 2, показанных на рис. 1. Пики при 2113 и 2036 см^{-1} обусловлены переходом феррицианид/ферроцианид. Область при $\sim 3700\text{--}2900$ см^{-1} насыщена из-за сильного поглощения образца и воды

присутствовать также абсорбционные изменения, связанные с окислением хлорофиллов антенны и(или) редокс-активного хлорофилла Хл_Z. В частности, для Хл_Z⁺/Хл_Z ранее были идентифицированы дифференциальные сигналы при 1727(+)/1699(–) см^{-1} и 1713(+)/1687–1684(–) см^{-1} [23]. Однако вклады таких сигналов в спектр 3 (рис. 1), по-видимому, невелики по сравнению с абсорбционными изменениями, связанными с P₆₈₀⁺/P₆₈₀.

Суммируя представленные выше данные, можно заключить, что двойной разностный спектр 3 (рис. 1) представляет собой достаточно «чистый» ИК-Фурье-спектр P₆₈₀⁺/P₆₈₀ изолированных комплексов ядра ФС2 из шпината.

На рис. 3 двойные разностные ИК-Фурье-спектры P₆₈₀⁺/P₆₈₀ комплексов ядра ФС2 шпината, рассчитанные, как описано выше, и нормированные по амплитуде дифференциального сигнала при 1724/1700 см^{-1} , сравниваются между собой в частотной области 1750–1670 см^{-1} при нескольких выбранных температурах в интервале между 100 и 265 К. Измерения при температурах выше 265 К в данной работе не производились из-за лабильности комплексов ядра и потенциальной возможности их деградации в условиях использованного относительно длительного освещения. Отметим, что при температурах ≤ 180 К ИК-Фурье-спектры, измеренные в присутствии смеси феррицианида калия и SiMo

(вставка к рис. 1) и при добавке только SiMo (данные не приведены), показывали также пики катион-радикала каротиноида Кар⁺ при ~ 1465 и ~ 1440 см^{-1} [24], которые, в основном, вычитались при расчетах соответствующих двойных разностных спектров.

Из рис. 3 видно, что частотное положение полос, а также общая форма ИК-Фурье-спектра в области валентных колебаний 13¹-кето С=О групп пигментов в целом сохраняются при понижении температуры образца, показывая, что фотоокисление P₆₈₀ вносит основной вклад в абсорбционные изменения при всех исследованных температурах. Однако интенсивности сигналов P₆₈₀⁺/P₆₈₀ в области 1724–1700 см^{-1} в измеренных двойных разностных спектрах в значи-

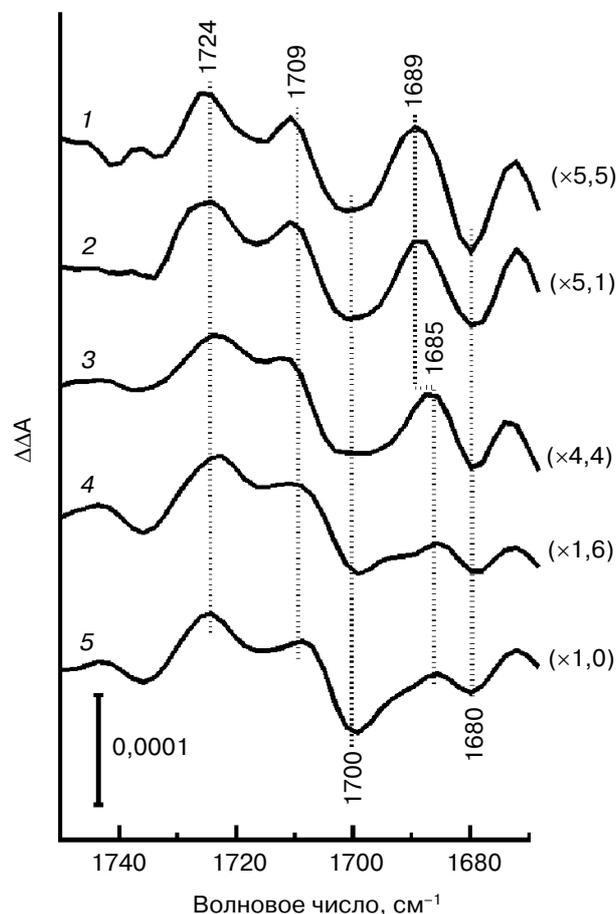


Рис. 3. Двойные разностные ИК-Фурье-спектры P₆₈₀⁺/P₆₈₀ безмарганцевых комплексов ядра ФС2 в области 13¹-кето С=О валентных мод при выбранных температурах: 1 – 100, 2 – 180, 3 – 230, 4 – 250 и 5 – 265 К. Спектры нормированы по амплитуде дифференциального сигнала при 1724/1700 см^{-1} (нормировочные коэффициенты указаны в скобках). Амплитуда дифференциального сигнала при 1724/1700 см^{-1} при 265 К составляла 6×10^{-4} ед оптической плотности

тельной степени зависели от температуры: они в несколько раз уменьшались при переходе от 265 к ~230 К (рис. 3, кривые 3–5) и далее относительно мало изменялись при более низких температурах. Понижение температуры образца сопровождалось также сильным уменьшением интенсивности дифференциального сигнала феррицианид/ферроцианид при 2113/2036 см^{-1} (данные не приведены). Вероятно, при температурах ниже ~230 К (рис. 3, кривые 1 и 2) в образцах происходило «замораживание» процессов молекулярной диффузии, что сопровождалось уменьшением эффективности переноса электрона с Feo_{D1}^- или Q_A^- на экзогенный феррицианид. Это, в свою очередь, приводило к уменьшению количества фотонакопленного P_{680}^+ и падению амплитуд соответствующих ИК-сигналов при неизменных условиях освещения. С целью улучшения представления малоинтенсивных сигналов, регистрируемых при низких температурах, двойные дифференциальные спектры на рис. 3 были нормированы по амплитуде сигнала $\text{P}_{680}^+/\text{P}_{680}$ при 1724/1700 см^{-1} (нормировочные коэффициенты указаны в скобках).

Согласно рис. 3 отрицательная полоса при 1680 см^{-1} присутствует в ИК-Фурье-спектрах $\text{P}_{680}^+/\text{P}_{680}$ при всех исследованных температурах. Вероятно, эта полоса является частью высокочастотного сдвига, соответствующий положительный пик которого располагается при 1689 см^{-1} при низких температурах (кривые 1 и 2) и слегка смещается до 1685 см^{-1} при температурах выше ~230 К (кривые 3–5). Из сравнения нормированных спектров $\text{P}_{680}^+/\text{P}_{680}$ (рис. 3) следует, что интенсивность сигнала при 1689/1680 см^{-1} сравнима с интенсивностью дифференциального сигнала при 1724/1700 см^{-1} при низких температурах, но существенно уменьшается при переходе от ~230 до 265 К. Этот факт указывает на различное влияние температуры на ИК-сигналы в этих двух частотных областях.

Рис. 4 представляет фотоиндуцированные (свет–минус–релаксация) электронные разностные спектры поглощения безмарганцевых комплексов ядра ФС2, измеренные в присутствии феррицианида калия и SiMo в Q_y -спектральной области (620–720 нм) в диапазоне температур между 100 и 265 К. Спектры нормированы друг к другу при 675–677 нм (нормировочные коэффициенты указаны в скобках). Из рисунка видно, что форма разностных спектров сильно зависит от температуры. При низких температурах (100 – ~200 К; кривые 1–3) спектры характеризуются выцветающими полосами при 675 и 686 нм и положительным пиком при 681 нм. При температурах выше ~200 К (рис. 4, кривые 4–6) положительный пик при 681 нм и

отрицательный пик при 686 нм сильно уменьшаются по амплитуде и не проявляются в разностных спектрах, доминирующей особенностью которых становится широкая выцветающая полоса при 675–677 нм со слабо выраженным плечом на ее длинноволновом склоне. Положительный сигнал при $\lambda \geq 690$ нм принадлежит поглощению фотогенерированного катион-радикала хлорофилла. Ранее структурированные разностные спектры наблюдались при криогенных температурах для состояния $\text{P}_{680}^+\text{Q}_\text{A}^-$ в комплексах ядра ФС2 цианобактерий [25, 26] и мембранных фрагментах из шпината [25], а также для обратимых фотоиндуцированных изменений поглощения в комплексах ядра ФС2 из шпината в присутствии SiMo [27]. Сходное влияние температуры на форму спектров $\text{P}_{680}^+\text{Q}_\text{A}^-/\text{P}_{680}\text{Q}_\text{A}$ наблюдалось также для комплексов ядра ФС2 цианобактерий [25]. Однако температурная зависимость абсорбционных изменений для комплек-

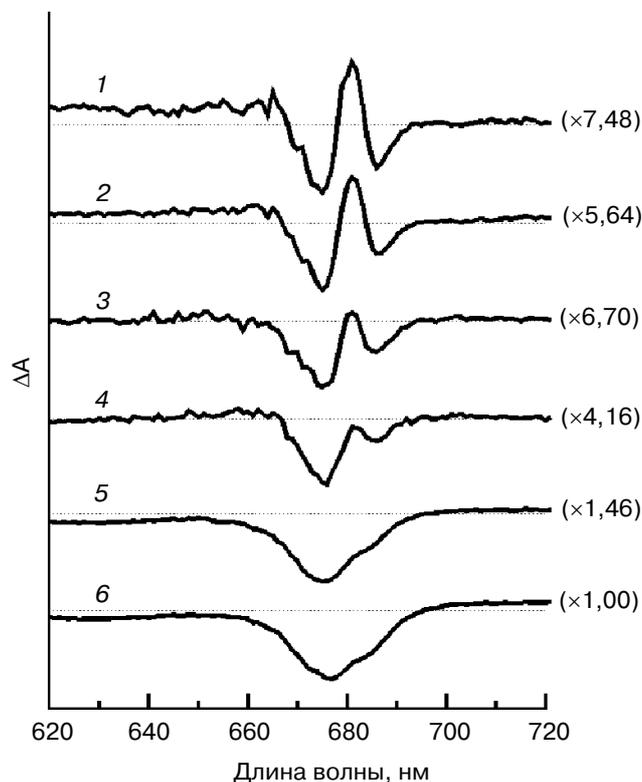


Рис. 4. Фотоиндуцированные (свет–минус–релаксация) электронные (620–720 нм) разностные спектры поглощения безмарганцевых комплексов ядра ФС2, измеренные в присутствии феррицианида калия и SiMo при различных температурах: 1 – 100, 2 – 150, 3 – 180, 4 – 230, 5 – 250 и 6 – 265 К. Горизонтальные линии, отмеченные точками, показывают базовые линии. Спектры нормированы при 675–677 нм (нормировочные коэффициенты указаны в скобках). Амплитуда выцветания при 677 нм в спектре при 265 К составляла 2×10^{-2} ед оптической плотности

сов ядра ФС2 растений, по-видимому, не исследовалась.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Известно, что возбуждение ФС2 световыми квантами индуцирует быстрый перенос электрона в активной ветви кофакторов РЦ с последовательным образованием состояний с разделенными зарядами $P_{680}^+ \text{Фео}_{D1}^-$ и $P_{680}^+ Q_A^-$ [28]. Мономерный хлорофилл Хл_{D1} , расположенный в активной ветви между димером P_{680} и феофитином Фео_{D1} [1–3], также вовлечен в фотоиндуцированный перенос электрона в качестве первичного донора [29–32] или первичного акцептора электрона [25, 31, 33]. В условиях, когда Мп-кластер в ФС2 не функционирует, а цит b559 находится в окисленном состоянии, молекулы Кар и Хл_Z могут играть роль вторичных доноров электрона для P_{680}^+ , конкурируя с малым квантовым выходом с рекомбинацией зарядов в состоянии $P_{680}^+ Q_A^-$ [34, 35]. В присутствии экзогенно введенных акцепторов электрона, способных с некоторой эффективностью извлекать электроны из фотогенерированных Фео_{D1}^- и (или) Q_A^- , в безмарганцевых препаратах ФС2 возможно фотонакопление редокс-состояний, включающих P_{680}^+ , Кар⁺, Хл_Z^+ , Q_A^- , а также восстановленные экзогенные акцепторы электрона.

В данной работе обратимые абсорбционные изменения, индуцированные постоянным освещением безмарганцевых препаратов комплексов ядра ФС2 из шпината в присутствии экзогенных акцепторов электрона, феррицианида калия и силикомолибдата, были измерены в средней инфракрасной области спектра. Исследования были сконцентрированы на выделении ИК-Фурье-спектра P_{680}^+/P_{680} из набора других фотоиндуцированных сигналов и исследовании его температурной зависимости в области 100–265 К. Параллельно были исследованы абсорбционные изменения в видимой области спектра в том же температурном интервале.

Наиболее примечательной особенностью температурной зависимости ИК-Фурье-спектров P_{680}^+/P_{680} (рис. 3) является явное различие в зависимости от температуры амплитуды дифференциального сигнала при 1724/1700 см^{-1} , принадлежащего P_{680}^+/P_{680} , и интенсивности сигнала при 1689/1680 см^{-1} , что указывает на различную природу этих сигналов. Этот факт делает маловероятным отнесение выцветания при 1680 см^{-1} димеру P_{680} и позволяет заключить, что полосы валентных колебаний 13¹-кето С=О групп молекул P_{D1} и P_{D2} в нейтральном состоянии не разрешаются в ИК-спектре. Полученные данные, по-

видимому, согласуются с предположением, что кетогруппы нейтрального P_{680} не образуют водородных связей и обе поглощают при ~1700 см^{-1} [8]. На основании анализа кристаллической структуры комплексов ядра ФС2 ранее была выдвинута гипотеза [11] о том, что D2-Set²⁸² может опосредованно (через молекулу воды) образовывать водородную связь с кетогруппой хлорофилла P_{D2} , сдвигая ее поглощение в низкочастотную область (до ~1680 см^{-1}) по отношению к поглощению соответствующей полосы в молекуле P_{D1} , находящейся в менее полярном окружении. Однако предполагаемая водородная связь, возможно, не является достаточно сильной, чтобы вызвать заметные различия в колебательных свойствах P_{D1} и P_{D2} .

Ранее [8] присутствие в ИК-Фурье-спектре P_{680}^+/P_{680} двух положительных пиков P_{680}^+ (при 1724 и 1709 см^{-1} на рис. 1) и одиночного отрицательного пика P_{680} при 1700 см^{-1} было интерпретировано в рамках модели, предполагающей, что положительный заряд в катионе P_{680}^+ в значительной степени (70–80%) локализуется на одной из двух молекул Хл. Возможно, неэквивалентность высокочастотных сдвигов колебаний кетогрупп P_{D1}^+ и P_{D2}^+ может быть также частично вызвана различиями в электростатических взаимодействиях образующихся катион-радикалов с белковым окружением, как это наблюдалось для РЦ *Rhodobacter (Rba.) sphaeroides* [36]. Полоса переноса «дырки» при ~3000 см^{-1} (рис. 2, кривая 1; [8]) отражает частичную делокализацию положительного заряда между двумя молекулами Хл в P_{680}^+ [21, 22]. Преимущественная локализация положительного заряда в ФС2 на хлорофилле P_{D1} предполагалась также из сравнения высокочастотных сдвигов полос поглощения кетогрупп (бактерио)хлорофиллов в ИК-Фурье-спектрах, измеренных для комплексов ядра ФС2 из *Synechocystis* sp. PCC 6803 и РЦ *Rba. sphaeroides* [11]. Согласно расчетам на основе теории функционала плотности [4] значительная локализация заряда на хлорофилле P_{D1} [37] является одним из важных факторов, определяющих высокий положительный редокс-потенциал P_{680} , необходимый для окисления воды в ФС2. Тот факт, что колебательные частоты кетогрупп молекул P_{D1} и P_{D2} существенно не изменяются с температурой в нейтральном и катион-радикальном состояниях (рис. 3), позволяет предполагать, что электронная структура P_{680}^+ (асимметричное распределение заряда) в комплексах ядра ФС2 сохраняется в интервале 100–265 К.

Если выцветающая ИК-полоса при 1680 см^{-1} и, соответственно, дифференциальный сигнал при 1689/1680 см^{-1} (рис. 1 и 3) не принадлежат P_{680} , возникает вопрос об их происхождении.

Ранее отрицательный пик при 1681 см^{-1} был обнаружен в разностном Q_A^-/Q_A ИК-Фурье-спектре восстановления первичного хинонного акцептора [18]. Предполагалось, что этот пик может быть обусловлен валентной модой карбонила белка (мода амид I) ФС2 [18]. Рис. 1, кривая 2 показывает, что отрицательный сигнал при 1681 см^{-1} также виден в ИК-Фурье-спектре комплексов ядра ФС2, измеренном в присутствии только SiMo, когда основной вклад вносят сигналы от Q_A^-/Q_A . Можно было бы предположить, что дифференциальный сигнал при $1689/1680\text{ см}^{-1}$ в ИК-Фурье-спектрах P_{680}^+/P_{680} (рис. 3) отражает изменения в полосе амид I, вызванные конформационными перестройками структуры окружающего белка при образовании P_{680}^+ . Однако такое объяснение было бы трудно согласовать с различным влиянием температуры на этот сигнал и сигнал при $1724/1700\text{ см}^{-1}$, принадлежащий P_{680}^+/P_{680} (рис. 3).

Интересным в этом отношении является тот факт, что широкая выцветающая полоса при $675\text{--}677\text{ нм}$, наблюдаемая в Q_y -области электронных разностных спектров при температурах выше $\sim 200\text{ К}$ (рис. 4, кривые 4–6), при более низких температурах разрешается в виде сложного структурированного сигнала с отрицательными полосами при 675 и 686 нм и положительным пиком при 681 нм . Хотя детальное отнесение этих спектральных особенностей конкретным пигментным кофакторам – предмет дискуссии [25–27], предполагается, что абсорбционные изменения, наблюдаемые в этой области спектра при криогенных температурах, включают выцветающую полосу, обусловленную фотоокислением P_{680} , и электрохромный сдвиг полосы поглощения близлежащего мономерного Хл, индуцированный P_{680}^+ [25, 26]. Возможно, дифференциальный сигнал при $1689/1680\text{ см}^{-1}$ (рис. 3) представляет собой колебательный аналог электрохромного сдвига, присутствующего в электронных разностных спектрах (рис. 4). Можно предполагать, что заряд на P_{680}^+ электростатически влияет на колебательную моду 13^1 -кето $\text{C}=\text{O}$ группы одного из мономерных хлорофиллов РЦ (Хл_{D1} или Хл_{D2}), сдвигая частоту этой моды от ~ 1680 до 1689 см^{-1} . Отмеченное выше отсутствие корреляции в поведении дифференциального сигнала при $1724/1700\text{ см}^{-1}$ (отражающего количество регистрируемого P_{680}^+) и сигнала при $1689/1680\text{ см}^{-1}$ в ответ на изменение температуры образца от ~ 230 до 265 К могло бы быть в этом случае объяснено увеличением эффективной диэлектрической постоянной белка при температурах выше $\sim 200\text{ К}$ (см. [38] для ссылок и дальнейшего обсуждения), что приводило бы к частичному экранированию электростати-

ческого взаимодействия и уменьшению электрохромного сдвига при повышенных температурах.

Другая интерпретация заключается в том, что сигнал при $1689/1680\text{ см}^{-1}$ отражает высокочастотный сдвиг валентной моды 13^1 -кето $\text{C}=\text{O}$ группы молекулы Хл_{D1} вследствие образования катиона Хл_{D1}⁺. Действительно, недавние электростатические расчеты [27] показали, что при низких температурах фотогенерированная положительно заряженная «дырка», первоначально локализованная в ФС2 на P_{680}^+ , может (частично) переноситься на молекулу Хл_{D1} вследствие сдвига редокс-потенциала пары Хл_{D1}⁺/Хл_{D1} относительно потенциала P_{680}^+/P_{680} в поле Q_A^- . При комнатной температуре эффект перераспределения заряда становится минимальным из-за экранирования поля Q_A^- за счет молекулярной реориентации среды (пигментов, белка, воды), и, как следствие, «дырка» локализуется только на P_{680}^+ . Уменьшение амплитуды дифференциального сигнала при $1689/1680\text{ см}^{-1}$ по отношению к амплитуде сигнала при $1724/1700\text{ см}^{-1}$ при повышении температуры (рис. 3) согласуется с такой интерпретацией. Наблюдаемый высокочастотный сдвиг полосы при 1680 см^{-1} (9 см^{-1}), соотносимый в данной модели с парой Хл_{D1}⁺/Хл_{D1}, соответствовал бы аналогичному сдвигу между полосами при 1700 и 1709 см^{-1} при окислении P_{680} (рис. 3, [8]).

Ранее на основе ИК-спектров образования триплетного состояния хлорофилла в изолированных РЦ ФС2 (D1–D2–cut b_{559} -комплексы) из шпината 13^1 -кето $\text{C}=\text{O}$ группе Хл_{D1} была приписана полоса при $1668\text{--}1670\text{ см}^{-1}$ [39]. В то же время из результатов фемтосекундных ИК-измерений предполагалось, что полоса кетогруппы Хл_{D1} в изолированных РЦ расположена при 1687 см^{-1} , смещаясь до 1697 см^{-1} при образовании катиона Хл_{D1}⁺ [29]. При анализе данных фемтосекундных ИК-измерений, выполненных на комплексах ядра ФС2 из *Synechocystis* sp. PCC 6803 дикого типа [11], предпочтение было отдано предположению о поглощении кетогруппы Хл_{D1} при $\sim 1670\text{ см}^{-1}$ [39]. В рамках этого соотношения дифференциальный сигнал при $1689/1680\text{ см}^{-1}$ в ИК-Фурье-спектрах P_{680}^+/P_{680} комплексов ядра (рис. 3) мог бы быть связан с 13^1 -кето $\text{C}=\text{O}$ валентной модой мономерного хлорофилла Хл_{D2}, расположенного в неактивной ветви кофакторов РЦ ФС2 [1–3]. Следует отметить, однако, что спектральные свойства комплексов D1–D2–cut b_{559} РЦ могут подвергаться частичным изменениям [26, 40, 41], возможно, из-за удаления интегральных антенных полипептидов CP43 и CP47. В настоящее время колебательные характеристики триплет-несущей молекулы Хл_{D1} [26] в более интактных комплексах ядра

ФС2, по-видимому, еще не определены. Таким образом, полученные в настоящей работе данные и информация, имеющаяся в литературе, не исключают возможность отнесения сигнала при 1689/1680 см⁻¹ также молекуле Хл_{D1}. Однако для того, чтобы сделать более определенные заключения, потребуются дальнейшие исследования.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 13-00-40297-К), Программы фундаментальных исследований РАН «Молекулярная и клеточная биология», Программы Президента РФ (грант НШ-4771.2014.4). Результаты, представленные на рис. 4, были получены при поддержке РНФ (грант 14-14-00789).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Zouni, A., Witt, H.T., Kern, J., Fromme, P., Krauss, N., Saenger, W., and Orth, P. (2001) Crystal structure of photosystem II from *Synechococcus elongatus* at 3.8 Å resolution, *Nature*, **409**, 739–743.
- Ferreira, K.N., Iverson, T.M., Maghlaoui, K., Barber, J., and Iwata, S. (2004) Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving center, *Science*, **303**, 1831–1838.
- Umena, Y., Kawakami, K., Shen, J.R., and Kamiya, N. (2011) Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at a resolution of 1.9 Å, *Nature*, **473**, 55–61.
- Takahashi, R., Hasegawa, K., and Noguchi, T. (2008) Effect of charge distribution over a chlorophyll dimer on the redox potential of P680 in photosystem II as studied by density functional theory calculations, *Biochemistry*, **47**, 6289–6291.
- Mattioli, T.A., Hoffmann, A., Robert, B., Schrader, B., and Lutz, M. (1991) Primary donor structure and interactions in bacterial reaction centers from near-infrared Fourier transform resonance Raman spectroscopy, *Biochemistry*, **30**, 4648–4654.
- Morita, E.H., Hayashi, H., and Tasumi, M. (1993) Temperature dependence of the light-induced infrared difference spectra of chromatophores and reaction centers from photosynthetic bacteria, *Biochim. Biophys. Acta*, **1142**, 146–154.
- Noguchi, T., Kusumoto, N., Inoue, Y., and Sakurai, H. (1996) Electronic and vibrational structure of the radical cation of P840 in the putative homodimeric reaction center from *Chlorobium tepidum* as studied by FTIR spectroscopy, *Biochemistry*, **35**, 15428–15435.
- Okubo, T., Tomo, T., Sugiura, M., and Noguchi, T. (2007) Perturbation of the structure of P680 and the charge distribution on its radical cation in isolated reaction center complexes of photosystem II as revealed by Fourier transform infrared spectroscopy, *Biochemistry*, **46**, 4390–4397.
- Lutz, M., and Mantele, W. (1991) *Chlorophylls* (Scheer, H., ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 855–902.
- Noguchi, T., and Berthomieu, C. (2005) *Photosystem II: the light-driven water/plastoquinone oxidoreductase* (Wydrzynski, T., and Satoh, K., eds), Springer, Dordrecht, pp. 367–387.
- Di Donato, M., Cohen, R.O., Diner, B.A., Breton, J., van Grondelle, R., and Groot, M.L. (2008) Primary charge separation in the photosystem II core from *Synechocystis*: a comparison of femtosecond visible/midinfrared pump-probe spectra of wild-type and two P680 mutants, *Biophys. J.*, **94**, 4783–4795.
- Berthold, D.A., Babcock, G.T., and Yocum, C.F. (1981) A highly resolved, oxygen-evolving photosystem II preparation from spinach thylakoid membranes, *FEBS Lett.*, **134**, 231–234.
- van Leeuwen, P.J., Nieveen, M.C., van de Meent, E.J., Dekker, J.P., and van Gorkom, H.J. (1991) Rapid and simple isolation of pure photosystem II core and reaction center particles from spinach, *Photosynth. Res.*, **28**, 149–153.
- Smith, P.J., Peterson, S., Masters, V.M., Wydrzynski, T., Styring, S., Krausz, E., and Pace, R.J. (2002) Magneto-optical measurements of the pigments in fully active photosystem II core complexes from plants, *Biochemistry*, **41**, 1981–1989.
- Вишнев М.И., Забелин А.А., Шкуропатова В.А., Янюшин М.Ф., Шувалов В.А., Шкуропатов А.Я. (2013) Химическая модификация пигментов комплекса ядра фотосистемы 2 борогидридом натрия, *Биохимия*, **78**, 492–500.
- Arnon, D.I. (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*, *Plant Physiol.*, **24**, 1–15.
- Berthomieu, C., Nabedryk, E., Mantele, W., and Breton, J. (1990) Characterization by FTIR spectroscopy of the photoreduction of the primary quinone acceptor Q_A in photosystem II, *FEBS Lett.*, **269**, 363–367.
- Hienerwadel, R., Boussac, A., Breton, J., and Berthomieu, C. (1996) Fourier transform infrared difference study of tyrosine D oxidation and plastoquinone Q_A reduction in photosystem II, *Biochemistry*, **35**, 15447–15460.
- Dejonghe, D., Andrianambintsoa, S., Berger, G., and Breton, J. (1998) *Photosynthesis: mechanisms and effects* (Garab, G., ed.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 1121–1124.
- Breton, J., Hienerwadel, R., and Nabedryk, E. (1997) *Spectroscopy of biological molecules* (Carmona, P., Navarro, R., and Hernanz, A., eds), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 101–102.
- Breton, J., Nabedryk, E., and Parson, W.W. (1992) A new infrared electronic transition of the oxidized primary electron donor in bacterial reaction centers: a way to assess resonance interactions between the bacteriochlorophylls, *Biochemistry*, **31**, 7503–7510.
- Reimers, J.R., and Hush, N.S. (2003) Modeling the bacterial photosynthetic reaction center. VII. Full simulation of the intervalence hole-transfer absorption spectrum of the special-pair radical cation, *J. Chem. Phys.*, **119**, 3262–3277.
- Kitajima, Y., and Noguchi, T. (2006) Photooxidation pathway of chlorophyll Z in photosystem II as studied by Fourier transform infrared spectroscopy, *Biochemistry*, **45**, 1938–1945.
- Noguchi, T., Mitsuka, T., and Inoue, Y. (1994) Fourier transform infrared spectrum of the radical cation of β-carotene photoinduced in photosystem II, *FEBS Lett.*, **356**, 179–182.
- Hillmann, B., Brettel, K., van Mieghem, F., Kamlowski, A., Rutherford, A.W., and Schlodder, E. (1995) Charge recombination reactions in photosystem II. 2. Transient absorbance difference spectra and their temperature dependence, *Biochemistry*, **34**, 4814–4827.
- Schlodder, E., Renger, T., Raszewski, G., Coleman, W.J., Nixon, P.J., Cohen, R.O., and Diner, B.A. (2008) Site-directed mutations at D1-Thr179 of photosystem II in *Synechocystis* sp. PCC 6803 modify the spectroscopic properties of the accessory chlorophyll in the D1-branch of the reaction center, *Biochemistry*, **47**, 3143–3154.

27. Shelaev, I.V., Gostev, F.E., Vishnev, M.I., Shkuropatov, A.Ya., Ptushenko, V.V., Mamedov, M.D., Sarkisov, O.M., Nadochenko, V.A., Semenov, A.Yu., and Shuvalov, V.A. (2011) P₆₈₀ (P_{D1}P_{D2}) and Chl_{D1} as alternative electron donors in photosystem II core complexes and isolated reaction centers, *J. Photochem. Photobiol. B*, **104**, 44–50.
28. Renger, G., and Holzwarth, A.R. (2005) *Photosystem II: the light-driven water/plastoquinone oxidoreductase* (Wydrzynski, T., and Satoh, K., eds), Springer, Dordrecht, pp. 139–175.
29. Groot, M.L., Pawlowicz, N.P., van Wilderen, L.J., Breton, J., van Stokkum, I.H., and van Grondelle, R. (2005) Initial electron donor and acceptor in isolated photosystem II reaction centers identified with femtosecond mid-IR spectroscopy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 13087–13092.
30. Holzwarth, A.R., Muller, M.G., Reus, M., Nowaczyk, M., Sander, J., and Rogner, M. (2006) Kinetics and mechanism of electron transfer in intact photosystem II and in the isolated reaction center: pheophytin is the primary electron acceptor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 6895–6900.
31. Romero, E., van Stokkum, I.H., Novoderezhkin, V.I., Dekker, J.P., and van Grondelle, R. (2010) Two different charge separation pathways in photosystem II, *Biochemistry*, **49**, 4300–4307.
32. Novoderezhkin, V.I., Romero, E., Dekker, J.P., and van Grondelle, R. (2011) Multiple charge-separation pathways in photosystem II: modeling of transient absorption kinetics, *Chem. Phys. Chem.*, **12**, 681–688.
33. Shelaev, I.V., Gostev, F.E., Nadochenko, V.A., Shkuropatov, A.Ya., Zabelin, A.A., Mamedov, M.D., Semenov, A.Ya., Sarkisov, O.M., and Shuvalov, V.A. (2008) Primary light energy conversion in tetrameric chlorophyll structure of photosystem II and bacterial reaction centers: II. Femto- and picosecond charge separation in PSII D1/D2/Cyt b559 complex, *Photosynth. Res.*, **98**, 95–103.
34. Faller, P., Fufezan, C., and Rutherford, A.W. (2005) *Photosystem II: the light-driven water/plastoquinone oxidoreductase* (Wydrzynski, T., and Satoh, K., eds), Springer, Dordrecht, pp. 347–365.
35. Shinopoulos, K.E., and Brudvig, G.W. (2012) Cytochrome b₅₅₉ and cyclic electron transfer within photosystem II, *Biochim. Biophys. Acta*, **1817**, 66–75.
36. Johnson, E.T., Muh, F., Nabedryk, E., Williams, J.C., Allen, J.P., Lubitz, W., Breton, J., and Parson, W.W. (2002) Electronic and vibronic coupling of the special pair of bacteriochlorophylls in photosynthetic reaction centers from wild-type and mutant strains of *Rhodobacter sphaeroides*, *J. Phys. Chem. B*, **106**, 11859–11869.
37. Diner, B.A., Schlodder, E., Nixon, P.J., Coleman, W.J., Rappaport, F., Lavergne, J., Vermaas, W.F., and Chisholm, D.A. (2001) Site-directed mutations at D1-His198 and D2-His197 of photosystem II in *Synechocystis* PCC 6803: sites of primary charge separation and cation and triplet stabilization, *Biochemistry*, **40**, 9265–9281.
38. Raszewski, G., Diner, B.A., Schlodder, E., and Renger, T. (2008) Spectroscopic properties of reaction center pigments in photosystem II core complexes: revision of the multimer model, *Biophys. J.*, **95**, 105–119.
39. Noguchi, T., Tomo, T., and Kato, C. (2001) Triplet formation on a monomeric chlorophyll in the photosystem II reaction center as studied by time-resolved infrared spectroscopy, *Biochemistry*, **40**, 2176–2185.
40. Hughes, J.L., Prince, B.J., Krausz, E., Smith, P.J., Pace, R.J., and Riesen, H. (2004) Highly efficient spectral hole-burning in oxygen-evolving photosystem II preparations, *J. Phys. Chem. B*, **108**, 10428–10439.
41. Acharya, K., Neupane, B., Zazubovich, V., Sayre, R.T., Picorel, R., Seibert, M., and Jankowiak, R. (2012) Site energies of active and inactive pheophytins in the reaction center of photosystem II from *Chlamydomonas reinhardtii*, *J. Phys. Chem. B*, **116**, 3890–3899.

TEMPERATURE DEPENDENCE OF LIGHT-INDUCED ABSORBANCE CHANGES ASSOCIATED WITH CHLOROPHYLL PHOTOOXIDATION IN Mn-DEPLETED CORE COMPLEXES OF PHOTOSYSTEM II

A. A. Zabelin^{1*}, V. A. Shkuropatova¹, A. Ya. Shkuropatov¹, V. A. Shuvalov^{1,2}

¹ *Institute of Basic Biological Problems, Russian Academy of Sciences, ul. Institutskaya 2, Pushchino, 142290 Moscow Region, Russia; fax: +7(4967)33-0532, E-mail: zabelin.bio@gmail.com*

² *Semenov Institute of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, Moscow 119991, Russia; fax: +7(495)651-2191*

Received May 15, 2015

Revision received June 19, 2015

Mid-infrared (4500–1150 cm⁻¹) absorbance changes induced by continuous illumination of Mn-depleted core complexes of Photosystem II (PSII) from spinach in the presence of exogenous electron acceptors (potassium ferricyanide and silicomolybdate) were studied by FTIR difference spectroscopy in the temperature range of 100–265 K. The FTIR difference spectrum for photooxidation of the chlorophyll dimer P₆₈₀ was extracted from a set of signals associated with oxidation of secondary electron donors (β-carotene, chlorophyll) and reduction of the primary quinone Q_A. Based on analysis of the temperature dependence of the P₆₈₀⁺/P₆₈₀ FTIR spectrum, it is concluded that frequencies of 13¹-keto-C=O stretching modes of neutral chlorophyll molecules P_{D1} and P_{D2}, which constitute P₆₈₀, are similar to each other, being located at ~1700 cm⁻¹. This fact together with a considerable difference between the stretching mode frequencies of keto-groups of cations P_{D1}⁺ and P_{D2}⁺ (1724 and 1709 cm⁻¹, respectively) is in agreement with a literature model (Okubo, T., et al., *Biochemistry*, 2007) suggesting that the positive charge in the dimer P₆₈₀⁺ is mainly localized on one of the two chlorophyll molecules. A partial delocalization of the charge between P_{D1} and P_{D2} molecules in P₆₈₀⁺ is supported by the presence of a characteristic electronic intervalence band at ~3000 cm⁻¹. It is shown that a bleaching band at 1680 cm⁻¹ in the P₆₈₀⁺/P₆₈₀ FTIR spectrum does not belong to P₆₈₀. A possible origin of this band is discussed taking into account the temperature dependence (100–265 K) of light-induced absorbance changes of PS II core complexes in the visible spectral region from 620 to 720 nm.

Key words: core complex of photosystem II, FTIR spectroscopy, chlorophyll, photooxidation, radical cation