

ИССЛЕДОВАНИЕ КИНЕТИКИ ПЕРЕНОСА ЭЛЕКТРОНОВ МЕЖДУ РЕДОКС-КОФАКТОРАМИ В ФОТОСИСТЕМЕ 1 МЕТОДАМИ ВЫСОКОЧАСТОТНОЙ ЭПР-СПЕКТРОСКОПИИ

© 2024 А.А. Суханов¹, Г.Е. Милановский^{2*}, Л.А. Витухновская^{2,3},
М.Д. Мамедов², К.М. Салихов¹, А.Ю. Семенов^{2*}

¹ Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр РАН»,
Казанский физико-технический институт им. Е.К. Завойского –
обособленное структурное подразделение ФИЦ КазНЦ РАН, 420111 Казань, Россия

² НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119992 Москва, Россия;
электронная почта: milanovsky@belozersky.msu.ru, semenov@belozersky.msu.ru

³ Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семёнова РАН,
119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 18.08.2024

После доработки 16.09.2024

Принята к публикации 23.09.2024

С помощью высокочастотной импульсной ЭПР-спектроскопии в Q-диапазоне при криогенных температурах впервые одновременно исследованы кинетики редокс-превращений первичного донора электрона P_{700}^+ и хинонного акцептора A_1^- в различных комплексах фотосистемы 1 (ФС 1) из цианобактерий *Synechocystis sp.* PCC 6803 во временном диапазоне 200 мкс – 10 мс. В комплексах A_1 -core ФС 1, не содержащих железо-серных (4Fe4S) кластеров, кинетики исчезновения сигналов A_1 и P_{700}^+ при температуре 100 К совпадали и имели характерное время $\tau \approx 500$ мкс, обусловленное рекомбинацией зарядов в ион-радикальной паре $P_{700}^+A_1^-$ в ветви редокс-кофакторов А. Кинетика обратного переноса электрона с A_1^- на P_{700}^+ в ветви редокс-кофакторов В с $\tau < 100$ мкс не могла быть зарегистрирована в связи с временными ограничениями метода. В нативных комплексах ФС 1, содержащих полный набор редокс-кофакторов, и в комплексах F_x -core, содержащих 4Fe4S-кластер F_x , кинетика сигнала A_1 была существенно быстрее, чем сигнала P_{700}^+ . Исчезновение сигнала A_1^- имело характерное время 280–350 мкс; было предположено, что, помимо обратного переноса электрона с A_1^- на P_{700}^+ с $\tau \approx 500$ мкс, в его кинетику вносит вклад прямой перенос электрона с A_1^- на 4Fe4S-кластер F_x , замедлившийся до 150–200 мкс. В кинетике восстановления P_{700}^+ можно было выделить компоненты, обусловленные обратным переносом электрона с A_1^- ($\tau \approx 500$ мкс) и с 4Fe4S-кластерами ($\tau = 1$ мс для F_x -core и $\tau > 5$ мс для нативных комплексов). Эти результаты качественно согласуются с данными по кинетике восстановления P_{700}^+ , полученными ранее с помощью импульсной абсорбционной спектроскопии при криогенных температурах.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: фотосистема 1, кинетика спектров ЭПР, низкотемпературные измерения, прямой и обратный перенос электрона, F_x -core, A_1 -core.

DOI: 10.31857/S0320972524100105 EDN: IOXZQI

ВВЕДЕНИЕ

Кинетика переноса электрона между редокс-кофакторами в фотосинтетических реакционных

центрах (РЦ) исследуется в течение нескольких последних десятилетий с помощью различных методов в разных временных диапазонах, от субпикосекундных до секундных времён. Наиболее

Принятые сокращения: РЦ – реакционный центр; ФС 1 – фотосистема 1; Хл – хлорофилл; 4Fe4S – железо-серные кластеры; A_0 – первичные акцепторы электрона, Хл; A_1 – филохинонные вторичные акцепторы электрона; A_1 -core – комплекс ФС 1, лишённый 4Fe4S-кластеров F_x , F_A , F_B ; F_x -core – комплекс ФС 1, лишённый 4Fe4S-кластеров F_A , F_B ; P_{700} – первичный донор электрона, специальная пара молекул Хл.

* Адресат для корреспонденции.

распространёнными методами исследования кинетики являются импульсная абсорбционная спектроскопия и ЭПР-спектроскопия.

Импульсная абсорбционная спектроскопия позволяет регистрировать индуцированные лазерными вспышками изменения поглощения в видимом, ближнем инфракрасном и ближнем ультрафиолетовом диапазонах. В некоторых случаях удаётся приписать наблюдаемые изменения поглощения конкретным редокс-реакциям [1].

Одним из наиболее изученных типов фотосинтетических РЦ является фотосистема 1 (ФС 1) [2–4]. Редокс-кофакторы ФС 1 включают первичный донор электрона P_{700} – димер молекул хлорофилла (Хл), первичный акцептор электрона A_0 – две пары молекул Хл в симметричных ветвях редокс-кофакторов A и B (A_{0A} и A_{0B}), молекулы филлохинонов A_1 (A_{1A} и A_{1B}), а также три последовательно расположенных железо-серных ($4Fe4S$) кластера F_X , F_A и F_B . Кофакторы P_{700} , A_0 , A_1 и F_X связаны с белковыми субъединицами ФС 1 $PsaA$ и $PsaB$, составляющими центральную часть РЦ ФС 1, а терминальные $4Fe4S$ -кластеры, F_A и F_B , связаны с наружной субъединицей $PsaC$ [5]. В условиях преимущественного возбуждения Хл РЦ происходит сверхбыстрое разделение зарядов между P_{700}^* и A_0 с образованием состояния $P_{700}^+A_0^-$ за субпикосекундные времена [6, 7]. Вслед за этим электрон переносится с A_0^- на A_1 с характерным временем ~ 25 пс [6, 8, 9]. Последующие реакции переноса электрона с A_{1A} и A_{1B} на F_X происходят

с характерными временами ~ 200 нс и ~ 20 нс соответственно, вслед за этим электрон с F_X переносится на терминальные $4Fe4S$ -кластеры F_A и F_B (см. обзор Brettel и Leibl [3] и рис. 1, а).

На рис. 1, б и в схематически изображены нативный комплекс ФС 1 и комплекс A_1 -core, в котором отсутствуют субъединица $PsaC$ и железо-серные кластеры F_X , F_A и F_B . На рисунке стрелками обозначены различные прямые и обратные реакции переноса электрона. Сплошными стрелками на рисунке обозначены реакции, регистрируемые в наших экспериментах, а пунктиром – перенос электрона, который происходит быстрее, чем время разрешения установки импульсной ЭПР-спектроскопии (см. детали в подписи к рисунку и в обсуждении результатов).

Индуктируемый лазерными вспышками перенос электрона между редокс-кофакторами исследуется в широком временном диапазоне. С помощью импульсной абсорбционной спектроскопии в основном регистрируется кинетика восстановления фотоокисленного димера Хл P_{700} , отражающая реакции обратного переноса электрона на первичный донор с различных редокс-кофакторов ФС 1 (вторичных акцепторов филлохинонов A_1 и $4Fe4S$ -кластеров F_X , F_A и F_B). Эти данные дают только косвенную информацию о прямом переносе электрона от восстановленного A_1^- на $4Fe4S$ -кластеры через соотношение амплитуд компонент рекомбинации зарядов, конкурирующих с реакциями прямого переноса электрона.

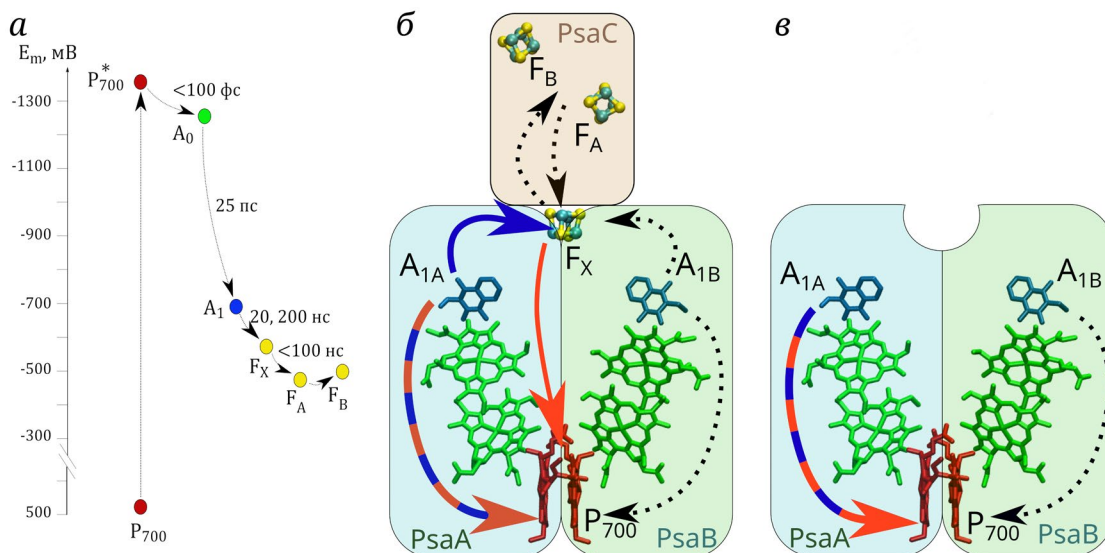


Рис. 1. Схема переноса электронов в ФС 1 цианобактерий: редокс-потенциалы основных кофакторов ФС 1 и времена прямых реакций переноса электрона (а); структурная схема нативных (б) и лишённых $4Fe4S$ -кластеров комплексов A_1 -core ФС 1 (в). Редокс-кофакторы показаны: димер Хл P_{700} – красным, Хл A_0 – зелёным, филлохиноны A_{1A} и A_{1B} – синим. $4Fe4S$ -Кластеры на рис. 1, б показаны жёлто-голубыми кубиками. $PsaA$, $PsaB$ и $PsaC$ – белковые субъединицы, содержащие кофакторы переноса электрона. Синими и красными стрелками показаны наблюдаемые в эксперименте прямые и обратные реакции переноса электрона соответственно, сине-красными стрелками показана реакция рекомбинации зарядов пары $P_{700}^+A_1^-$, наблюдаемая при исчезновении как сигнала P_{700}^* , так и A_1^- . Пунктиром на панелях б и в показан перенос электрона, не регистрируемый в представленных ниже экспериментах

Что касается кинетики окисления филлохинонного акцептора A_1 , то её, как правило, регистрируют косвенно с помощью измерения электрохромного каротиноидного сдвига на длине волны 480 нм. В некоторых случаях удаётся сопоставить кинетику редокс-реакций P_{700}/P_{700}^+ и кинетику каротиноидного сдвига, отражающую, главным образом, редокс-переходы филлохинона A_1^-/A_1 . Однако следует отметить, что этот метод является косвенным и регистрирует не только кинетику исчезновения семихинон-аниона A_1^- , но и наличие заряда на димере Хл P_{700}^+ [10–12]. Прямое измерение перехода A_1^-/A_1 возможно на длине волны ~380 нм [13, 14], однако применимость этого метода ограничена из-за низкого соотношения сигнал/шум.

Альтернативным методом регистрации кинетики переноса электрона в ФС 1 является высокочастотная ЭПР-спектроскопия в Q- и W-диапазонах [15]. Преимуществом данного метода является чёткое разделение сигналов P_{700}^+ и A_1^- – они наблюдаются при различных значениях напряжённости магнитного поля. Его ограничением является то обстоятельство, что традиционные измерения в Q- и W-диапазонах СВЧ возможны только при криогенных температурах в водно-глицериновой смеси и в относительно узком временном диапазоне [16]. В то же время недавно было обнаружено, что измерения спектров и кинетики изменения сигналов ЭПР в W-диапазоне возможны и при комнатной температуре в комплексах бактериальных РЦ, а также в комплексах ФС 1 в высушенных стекловидных трегалозных матрицах [17, 18]. Кроме того, с помощью импульсной ЭПР-спектроскопии в СВЧ диапазонах частот Q и W можно на одном и том же образце одновременно регистрировать как восстановление P_{700}^+ , так и окисление A_1^- , хотя и в ограниченном временном диапазоне. При этом кинетика восстановления P_{700}^+ в выделенных РЦ ФС 1 будет отражать обратный перенос электрона от восстановленных акцепторов, а кинетика окисления A_1^- – как обратный перенос на P_{700}^+ , так и прямой перенос электрона на 4Fe4S-кластеры. Кинетика исчезновения сигнала ЭПР спин-коррелированной ион-радикальной пары $P_{700}^+A_1^-$ была ранее исследована на нативных комплексах из цианобактерии *Synechococcus lividus* [19, 20]. Сопоставление кинетики восстановления P_{700}^+ с кинетикой окисления A_1^- на препаратах ФС 1, содержащих различное количество 4Fe4S-кластеров, позволяет определить кинетику и оценить соотношение прямых и обратных реакций с участием филлохинонов A_1^- .

В настоящей работе кинетики восстановления P_{700}^+ и окисления A_1^- были исследованы при температуре 100 К в водно-глицериновой смеси на препаратах нативных комплексов ФС 1, пре-

паратах F_x -core, не содержащих субъединицы PsaC и терминальных 4Fe4S-кластеров F_A и F_B , а также препаратах A_1 -core, не содержащих всех трёх железо-серных кластеров. Для сопоставления данных были также произведены измерения кинетики восстановления P_{700}^+ при комнатной температуре с помощью импульсной абсорбционной спектрофотометрии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение нативных комплексов ФС 1.

Культуру клеток *Synechocystis* sp. PCC 6803 выращивали в среде BG-11 [21] при постоянном освещении белым светом. Клетки собирали в логарифмической фазе роста (примерно через 7 дней) центрифугированием и дважды промывали в 50 mM буфере HEPES-NaOH (pH 7,5).

Тримерные комплексы ФС 1 выделяли и очищали, согласно ранее описанной методике [22], с небольшими изменениями. Тилакоидные мембраны при концентрации Хл ~0,6 мг/мл растворяли в течение 90 мин при 4 °C в присутствии н-додецил-β-D-мальтозида (ДМ) до концентрации 1% (w/v). Неразрушенные мембраны осаждали центрифугированием в течение 15 мин при 14 000 g и супернатант наносили на линейный градиент сахарозы (5–20%, w/v). Градиент центрифугировали в течение 3 ч в вертикальном роторе VTi 50 (полученном в рамках Программы развития МГУ имени М.В. Ломоносова) («Beckman Coulter», США) при 200 000 g и собирали нижнюю темно-зелёную полосу, содержащую тримеры ФС 1. После диализа исходную суспензию ФС 1 в 25 mM буфере HEPES-NaOH (pH 7,5), содержащую 0,03% (m/v) ДМ, концентрировали до концентрации Хл 3 мг/мл (30 мкМ ФС 1).

Получение комплексов F_x -core. Для получения комплексов ФС 1, лишённых терминальных железо-серных кластеров F_A/F_B (обозначаемых как комплексы F_x -core), нативные комплексы ФС 1 при концентрации Хл 220 мкг/мл инкубировали в среде, содержащей 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) и 6,8 M мочевины в течение 90 мин при комнатной температуре в темноте. Затем суспензию многократно промывали 50 mM Tris-HCl-буфером (pH 8,0)/0,03% ДМ вплоть до конечной концентрации мочевины ~0,03% (более 30 циклов в зависимости от исходного объёма образца). Суспензию ядерных частиц F_x концентрировали с использованием концентраторов Centricon-50 (50 кДа, «Amicon», США) до концентрации ~2,5–3,0 мг Хл/мл.

Получение комплексов P_{700} - A_1 -core. Для получения комплексов ФС 1, лишённых всех трёх железо-серных кластеров F_x и F_A/F_B (обозначенных как комплексы A_1 -core), комплексы F_x -core

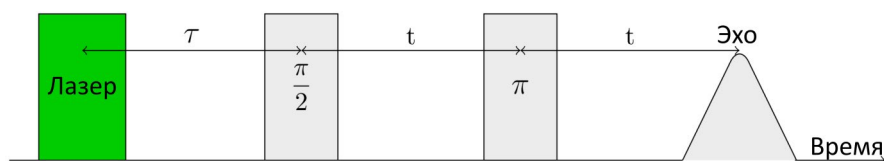


Рис. 2. Протокол эксперимента регистрации кинетики изменения сигналов ЭПР

при концентрации Хл 220 мкг/мл инкубировали в среде, содержащей 50 мМ Tris-HCl (pH 8,0)-буфер, 5 мМ феррицианида калия и 3,4 М мочевины в течение 2 ч при комнатной температуре в темноте. Для удаления мочевины и феррицианида суспензию ФС 1 несколько раз промывали 50 мМ Tris-HCl (pH 8,0)-буфером до конечных концентраций мочевины и феррицианида $\sim 0,03\%$ и $\sim 0,005\%$ соответственно. Суспензию комплексов A_1 -core концентрировали с использованием концентраторов Centricon-50 до концентрации $\sim 2,5$ мг Хл/мл.

Импульсная микросекундная абсорбционная спектрофотометрия. Кинетику восстановления P_{700}^+ , индуцированного лазерной вспышкой, измеряли на длине волны 820 нм [1, 17]. В качестве источника возбуждения использовался лазер YG-481 («Quantel», Франция) с длиной волны 532 нм, интенсивностью 30 мДж и полушириной импульса 12 нс, в качестве источника измерительного света использовался лазерный диод DC25A (длина волны 820 нм) («Spindler and Hoyer», Германия). Временное разрешение установки составило ~ 100 нс [1, 17]. Препараты с концентрацией Хл 50 мкг/мл помещались в кварцевую кювету с оптическим путём 10 мм. Измерения проводили в присутствии 10 мМ аскорбата натрия в 50 мМ HEPES-буфере (pH 7,5). Кинетику сигнала снимали в логарифмической развёртке, что позволило эффективно снизить шумы во всём временном диапазоне от 1 мкс до 1 с.

Импульсная ЭПР-спектроскопия. Измерения проводились в Q-диапазоне частот (33,913–33,952 ГГц) на ЭПР-спектрометре Elexsys E580 («Bruker», Германия-США) с использованием резонатора EN 5107D2 и продувочного криостата CF935 («Oxford Instruments», Великобритания). Спектрометр был модернизирован с помощью твердотельного усилителя мощности СВЧ Q-диапазона, обеспечивающего выходную мощность 150 Вт на частоте 34 ГГц. В качестве источника возбуждения использовался лазер Brilliant B («Quantel») с длиной волны 532 нм, интенсивностью 1 мДж, с частотой повторения импульсов 10 Гц и полушириной импульса 12 нс.

Лазерный импульс индуцирует разделение зарядов в РЦ ФС 1. После временной задержки τ последовательность двух СВЧ импульсов формирует сигнал первичного электронного спинового эха. Регистрируется зависимость интенсивности

сигнала эха в зависимости от интервала времени τ между лазерным импульсом и первым СВЧ импульсом. Длительность СВЧ $\pi/2$ -импульса составляла 16 нс, задержка между двумя СВЧ импульсами составляла 440 нс. В процессе записи кинетик изменения сигналов ЭПР длительность СВЧ импульсов и задержка между двумя СВЧ импульсами не изменялись. Измерения кинетик изменения сигналов ЭПР для P_{700}^+ и A_1^- проводились при различных значениях магнитных полей в Q-диапазоне, т.к. сигналы, соответствующие P_{700}^+ и A_1^- , в спектре ЭПР имеют разные значения резонансных полей [19, 23]. Протокол эксперимента показан на рис. 2.

Анализ кинетик сигналов P_{700}^+ и A_1^- . Кинетика индуцируемых лазерной вспышкой сигналов ЭПР анализировалась с использованием набора скриптов для Matlab R2023a [24]. Кинетика изменения сигнала аппроксимировалась заданным числом экспонент (подробности в тексте) методом наименьших квадратов. В большинстве случаев достаточно хорошее разложение достигалось с помощью суммы одной восходящей экспоненциальной функции с характерным временем ~ 60 мкс и одной убывающей экспоненциальной функции с характерным временем 300–800 мкс (см. Результаты).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Регистрация кинетики восстановления P_{700}^+ с помощью импульсной абсорбционной спектроскопии. Кинетика восстановления P_{700}^+ отражает обратный перенос электрона от различных акцепторов РЦ ФС 1, а также возможное взаимодействие РЦ с экзогенными донорами и акцепторами электронов. При комнатной температуре эти реакции регистрируются как уменьшение поглощения на длине волны 820 нм после лазерной вспышки [25]. На рис. 3 показаны кинетики рекомбинации зарядов в трёх типах препаратов ФС 1: комплексах A_1 -core, лишённых всех трёх 4Fe4S-кластеров (F_x , F_A и F_B), комплексах F_x -core, лишённых кластеров F_A и F_B , а также нативных комплексах, содержащих полный набор 4Fe4S-кластеров.

В кинетике рекомбинации зарядов при комнатной температуре в случае комплексов

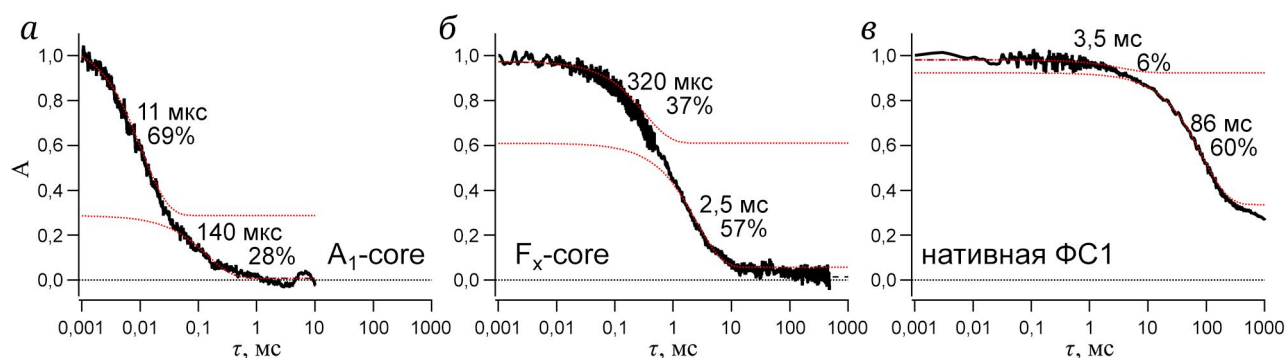


Рис. 3. Индуцированная лазерными вспышками рекомбинация зарядов в комплексах ФС 1, регистрируемая как уменьшение поглощения на длине волны 820 нм при комнатной температуре для комплексов A_1 -core (а), комплексов F_x -core (б) и полного комплекса ФС 1 (в). Указаны характерные времена и относительные амплитуды основных компонент рекомбинации. Поглощение указано в условных единицах, нормированных на максимум сигнала

A_1 -core выявляются две компоненты с характерными временами (τ) ~ 10 и 140 мкс (рис. 3, а), которые соответствуют обратному переносу электрона с молекул филлохинона A_{1B} и A_{1A} в симметричных ветвях кофакторов [14, 26, 27]. В приведённых экспериментальных кривых доминирует более быстрая компонента с амплитудой почти 70%. Соотношение между быстрой и медленной компонентами рекомбинации варьирует в зависимости от условий приготовления препаратов A_1 -core и использованного штамма цианобактерий [13, 14] и, вероятно, отражает не только асимметрию образования ион-радикальных пар $P_{700}^+A_{1A}^-$ и $P_{700}^+A_{1B}^-$ в симметричных ветвях редокс-кофакторов A и B , но и возможное повреждение и частичное удаление молекул филлохинона из сайтов A_1 , происходящее при выделении препаратов A_1 -core.

В кинетике обратного переноса электрона в комплексах F_x -core, лишённых терминальных кластеров F_A и F_B , выявляются две компоненты с характерными временами ~ 300 мкс и 2,5 мс и относительными амплитудами 40 и 60% соответственно (рис. 3, б). Медленная компонента может быть однозначно приписана рекомбинации с кластера F_x ; что же касается более быстрой компоненты, то она в принципе может соответствовать рекомбинации с A_{1A} во фракции комплексов с повреждённым F_x . С другой стороны, характерное время τ данной компоненты вдвое медленнее, чем кинетика рекомбинации пары $P_{700}^+A_{1A}^-$, наблюдавшаяся в препаратах A_1 -core (140 мкс), а ожидаемая более быстрая компонента пары $P_{700}^+A_{1B}^-$ (10 мкс) на этих препаратах отсутствует. Ранее было предположено, что обратный перенос электрона с F_x на P_{700}^+ имеет гетерогенную кинетику, обусловленную наличием различных конформационных состояний ФС 1, как минимум при криогенных температурах [1, 13]. Нами ранее было показано, что кластер F_x является наиболее

подверженным конформационным изменениям из кофакторов ФС 1 [1, 25]. При комнатной температуре маловероятна конформационная гетерогенность, аналогичная «замерзанию» конформации комплекса ФС 1 при понижении температуры ниже 200 К. Однако аналогичная неоднородность образца может достигаться в результате химической обработки пигмент-белкового комплекса мочевиной при приготовлении образцов F_x -core. В этом случае обе компоненты, 300 мкс и 2,5 мс, могут быть приписаны обратному переносу электрона с F_x в различных конформациях РЦ, возможно, способствующих преимущественной локализации отрицательного заряда на различных атомах кластера F_x .

В нативных комплексах ФС 1 кинетика рекомбинации зарядов, представленная на рис. 3, в, главным образом обусловлена обратным переносом электрона от терминальных кластеров F_A и F_B ($\tau \approx 90$ мс, относительная амплитуда 60%). Более быстрая минорная компонента (6%) обусловлена наличием небольшой фракции белка, не содержащей субъединицы $PsaC$ и кластеров F_A/F_B , а более медленная компонента на временах сотен миллисекунд и секунд – восстановлением P_{700}^+ от экзогенных доноров электрона [25].

Разложение кинетик рекомбинации зарядов на экспоненциальные компоненты в трёх типах комплексов ФС 1 представлено в табл. 1.

Регистрация кинетики восстановления P_{700}^+ и окисления A_1^- с помощью импульсной ЭПР-спектроскопии. После фотовозбуждения в нулевой момент времени разделённая пара зарядов в РЦ ФС 1 образуется в синглетном состоянии, при котором суммарный спин электронов равен нулю. Это состояние – немагнитное, и оно не даёт сигнала ЭПР. Благодаря разнице резонансных частот разделённых зарядов и диполь-дипольному спин-спиновому взаимодействию между зарядами пара электронов переходит из синглетного состояния

Таблица 1. Компоненты окисления P_{700}^+ при комнатной температуре, измеренные спектрофотометрически на длине волны 820 нм.

Тип комплекса ФС 1	τ , мс			Относительная амплитуда, %			
	τ_1	τ_2	τ_3	A_1	A_2	A_3	Долгоживущие компоненты
A_1 -core	0,011/0,14			69/28			3
F_x -core	0,32	2,5		37	57		6
Нативный		3,5	86		6	60	34

Примечание. Компоненты рекомбинации соответствуют: 1 – рекомбинации с A_1 (две субкомпоненты для комплексов A_1 -core), 2 – рекомбинации с кластера F_x , 3 – рекомбинации с кластеров $[F_A/F_B]$.

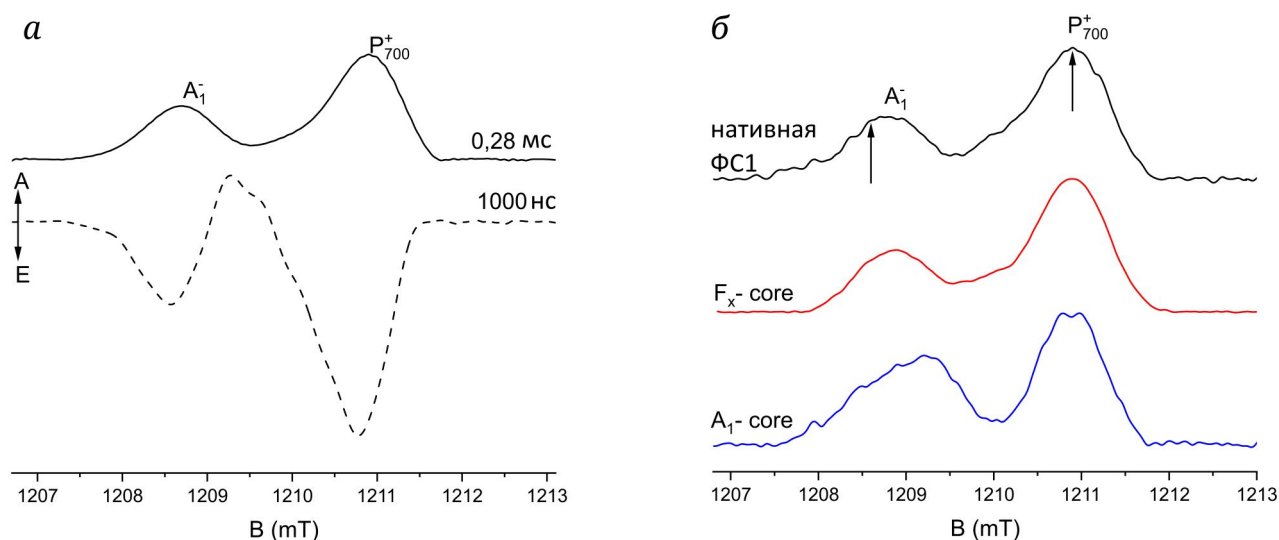


Рис. 4. Эхо-детектированные спектры ЭПР трёх комплексов ФС 1 при 100 К в Q-диапазоне СВЧ. а – Спектры нативной ФС 1 при двух различных временных задержках; б – спектры нативного комплекса ФС 1, F_x -core- и A_1 -core-комплексов, записанные при временной задержке 0,28 мс. Стрелками показаны точки спектра, в которых снимались кинетики. А, Е – поглощение и испускание СВЧ образцом соответственно

в триплетное; в результате наблюдается дипольная спиновая поляризация каждого электрона пары [28, 29]. Эта дипольная поляризация по амплитуде на 1–2 порядка превышает равновесную поляризацию электронных спинов и известна как гиперполяризация или химическая поляризация электронных спинов (далее по тексту – неравновесная поляризация) [30]. В результате спиновой динамики неравновесная поляризация затухает, и в спектре ЭПР мы наблюдаем равновесный сигнал, который спадает с характерными временами жизни возбуждённых электронных состояний (рекомбинации зарядов). На рис. 4, а (а также рис. П1 и П2 в Приложении) хорошо видно, как отличаются формы спектров ЭПР для случаев формирования неравновесной поляризации и достижения равновесного состояния в РЦ. В начальный момент времени с задержкой 1 мкс после лазерного импульса наблюдается спектр ЭПР, обусловленный формированием неравновесной поляризации (рис. 4, а, пунктирная линия),

в котором видны сигналы в форме испускания и поглощения СВЧ образцами. С увеличением времени задержки данный сигнал преобразуется в сигнал поглощения (рис. 4, а, сплошная линия), который обусловлен достижением равновесного состояния. На рис. 4, б приведены равновесные спектры трёх типов комплексов ФС 1 на временной задержке 280 мкс; вертикальными стрелками отмечены значения напряжённости магнитного поля в спектрах ЭПР, при которых производились измерения кинетики. Для лучшего разделения кинетик рекомбинаций электронных состояний и затухания неравновесной поляризации удобно выбирать именно эти значения магнитных полей [19, 23]. На кинетических кривых, представленных ниже на рис. 5–7, на временах < 200 мкс можно наблюдать переход сигнала из формы испускания в форму поглощения, который во всех случаях хорошо аппроксимируется экспонентой с характерным временем ~60 мкс. На более длительных временах наблюдается спад сигнала ЭПР,

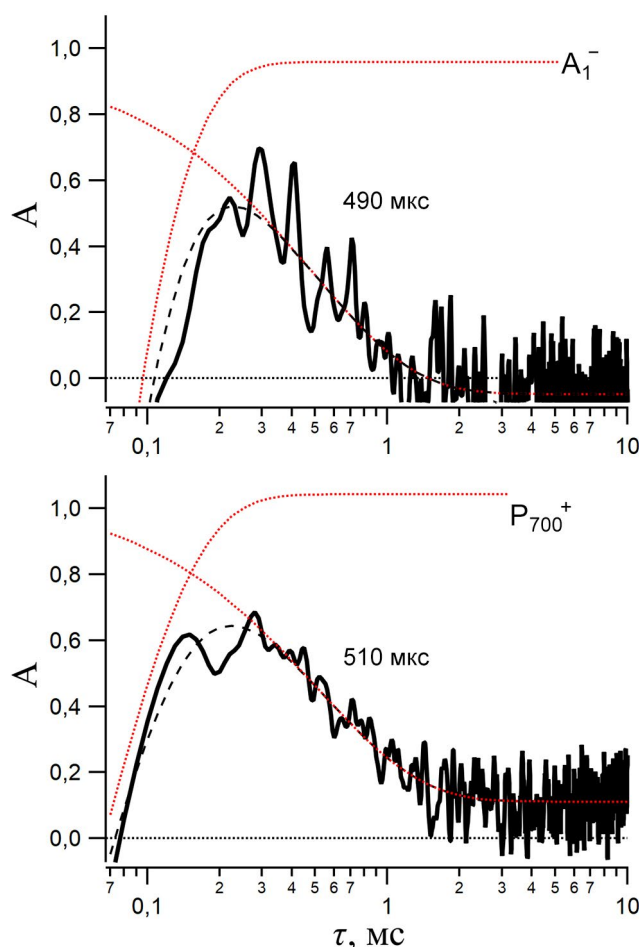


Рис. 5. Кинетика ЭПР-сигналов A_1^- и P_{700}^+ в комплексах A_1 -core ФС 1 при 100 К. Исходная кинетика показана чёрными сплошными линиями, компоненты фиттинга показаны тонкими красными пунктирными линиями, сумма компонентов фиттинга показана чёрной пунктирной линией. Амплитуда сигнала указана в условных единицах, нормированных на максимум компонент сигнала

обусловленный кинетикой исчезновения A_1^- или P_{700}^+ . Для примера на рис. ПЗ в Приложении показано, как выглядят кинетики при значении напряжения магнитного поля, при котором не наблюдается изменения формы линии в спектре ЭПР, т.е. сигнал положителен уже при начальных задержках.

На рис. 5–7 представлены кинетики спада индуцированных лазерными вспышками сигналов ЭПР, соответствующих радикалам P_{700}^+ и A_1^- , измеренные на комплексах ФС 1, лишённых всех 4Fe4S-кластеров (A_1 -core, рис. 5), только терминальных кластеров [F_A/F_B] (F_X -core, рис. 6) или же нативных комплексов (рис. 7).

Можно предполагать, что в комплексах A_1 -core характерные времена жизни P_{700}^+ и A_1^- должны совпадать ($\tau_P = \tau_{A1}$), поскольку в системе возможна только одна реакция рекомбинации

зарядов (с филлохинонов A_1^- на P_{700}^+). Наличие какого-то альтернативного пути переноса электрона с A_1^- должно уменьшить характерное время жизни радикала A_1^- , но не P_{700}^+ . Такая ситуация ожидается для F_X -core и нативных комплексов ФС 1, так как в этих системах появляется возможность прямого переноса электрона от A_1^- на 4Fe4S-кластеры. Кроме того, в F_X -core и нативных комплексах ФС 1 должна происходить более медленная рекомбинация зарядов между 4Fe4S-кластерами и P_{700}^+ , поэтому для этих систем ожидается, что $\tau_{A1} < \tau_P$.

Приведённые ниже экспериментальные результаты качественно хорошо согласуются с этими ожидаемыми результатами: в ряду « A_1 -core → F_X -core → нативные комплексы» кинетика окисления A_1^- ускорялась, в то время как кинетика восстановления P_{700}^+ , наоборот, замедлялась, что указывает на различные схемы электронного переноса в исследуемых вариантах ФС 1.

На рис. 5 представлены изменения сигналов ЭПР в комплексах A_1 -core, в которых конечным акцептором электрона являются молекулы филлохинона A_{1A} и A_{1B} . Кинетика окисления A_1^- (вверху) и кинетика восстановления P_{700}^+ (внизу) имеют близкие характерные времена $\tau \approx 500$ мкс. Это совпадение демонстрирует, что кинетики спада обоих сигналов ЭПР обусловлены одной и той же реакцией рекомбинации зарядов в ион-радикальной паре $P_{700}^+A_1^-$.

Как показано на рис. 3, рекомбинация зарядов с филлохинонов A_{1B} и A_{1A} при комнатной температуре характеризуется значениями $\tau \approx 10$ и 140 мкс соответственно. Согласно ранее полученным данным [27], скорость реакции обратного переноса электрона с A_{1B} практически не зависит от температуры и маскируется в кинетике изменения сигнала ЭПР вышеописанным затуханием неравновесной поляризации. Таким образом, наблюдаемая кинетика сигнала ЭПР с $\tau \approx 490$ мкс может быть однозначно приписана рекомбинации с филлохинона A_{1A} . Замедление кинетики при понижении температуры от 140 к 490 мкс хорошо соответствует ранее наблюдаемой температурной зависимости этой реакции, зарегистрированной спектрофотометрически по сигналу восстановления P_{700}^+ на препаратах ФС 1 из цианобактерий *Synechococcus* sp. PCC 7002 [27] и *Synechocystis* sp. PCC 6803 [1], лишённых всех или части 4Fe4S-кластеров соответственно.

На рис. 6 представлена кинетика исчезновения сигналов ЭПР A_1^- и P_{700}^+ на препаратах ФС 1 F_X -core, которые содержат только 4Fe4S-кластер F_X и не содержат терминальных кластеров F_A и F_B и белковой субъединицы PsaC. Характерное время спада сигнала A_1^- ($\tau = 350$ мкс) здесь суще-

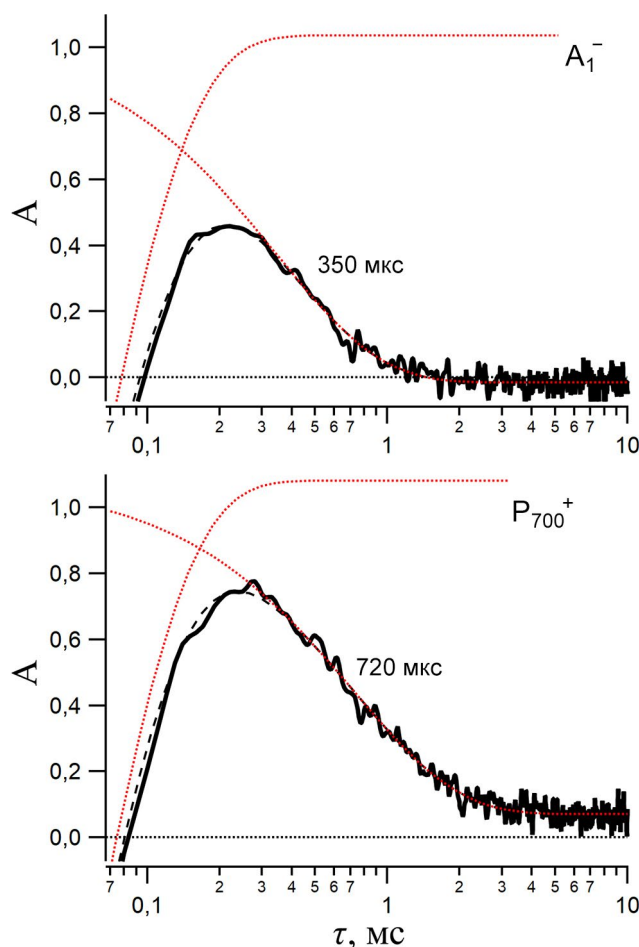


Рис. 6. Кинетика ЭПР-сигналов A_1^- и P_{700}^+ в комплексах F_x -core ФС 1 при 100 К. Обозначения такие же, как на рис. 5

ственно быстрее, чем время спада сигнала P_{700}^+ ($\tau = 720$ мкс); очевидно, что в отличие от препаратов A_1 -core, наблюдаемые кинетики не могут быть приписаны одной и той же реакции. Вместе с тем реакция восстановления P_{700}^+ должна отражать как минимум кинетику рекомбинации с филохинонов A_1 , то есть кинетику ЭПР сигнала P_{700}^+ должна включать в себя субкомпоненту, сходную со спадом сигнала A_1^- . Исходя из данных импульсной абсорбционной спектроскопии (рис. 3, табл. 1 и работа Milanovsky et al. [1]), в сигнале P_{700}^+ комплексов F_x -core можно ожидать наличия как минимум двух компонент рекомбинации – с кофакторов A_1^- и F_x^- . Низкое соотношение сигнал/шум не позволяет провести однозначного разложения кинетики сигналов ЭПР на две экспоненциальные составляющие. Однако, если предположить, что оба сигнала (A_1^- и P_{700}^+) включают экспоненциальную компоненту с характерным временем 400–500 мкс (соответствующую времени обратного переноса электрона с A_1^- и наблюдавшуюся в комплексах A_1 -core), то кинетика сигнала A_1^- также будет включать более быструю компоненту с

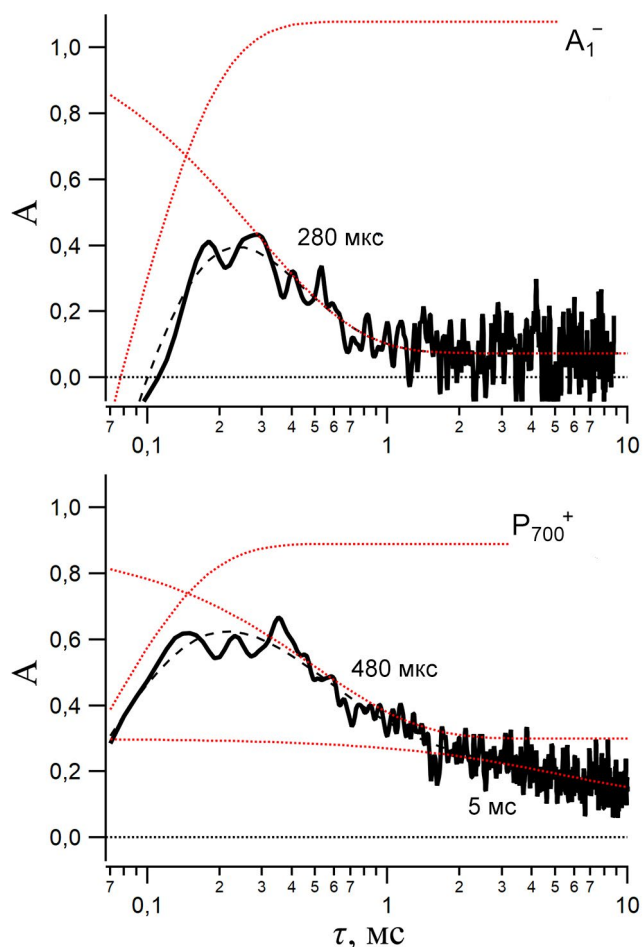


Рис. 7. Кинетика ЭПР-сигналов A_1^- и P_{700}^+ в комплексах нативной ФС 1 при 100 К. Обозначения такие же, как на рис. 5

$\tau_0 < 200$ мкс (на пределе временного разрешения метода), а кинетика сигнала P_{700}^+ – более медленную компоненту с $\tau_2 = 910$ мкс (см. табл. 2). При таком разложении кинетика обоих сигналов может быть интерпретирована как сочетание трёх различных реакций:

- в случае сигнала A_1^- более быстрая компонента ($\tau_0 < 200$ мкс) может быть приписана сильно замедленному при низкой температуре прямому переносу электрона с A_1^- на F_x , а более медленная ($\tau_1 = 420$ мкс) – рекомбинации зарядов в ион-радикальной паре $P_{700}^+A_1^-$ (см. схему переноса зарядов на рис. 1). Ранее было показано [13], что прямой перенос с A_1^- на F_x , происходящий при комнатной температуре за время ~ 200 нс, при температуре 170 К может замедляться до десятков микросекунд;

- в кинетике сигнала P_{700}^+ более быстрая компонента (с той же $\tau_1 = 420$ мкс) соответствует обратному переносу электрона с A_1^- , а более медленная ($\tau_2 = 910$ мкс) – с F_x^- .

В нативных комплексах ФС 1 кинетика сигнала ЭПР A_1^- аппроксимируется экспонентой

Таблица 2. Компоненты кинетики изменения сигналов ЭПР A_1^- и P_{700}^+

Сигнал ЭПР	Тип комплекса	τ , мс			Относительная амплитуда A, %			
		τ_0	τ_1	τ_2	A_0	A_1	A_2	Долгоживущие компоненты
P_{700}	A_1 -core		0,51			89		11
	F_x -core			0,72			94	6
			0,42	0,91		45	50	6
	нативный			1,1			75	25
			0,48	5,07		66	20	14
A_1	A_1 -core		0,49			105		-5
	F_x -core		0,35			102		-2
		0,19	0,42		51	50		-1
	нативный		0,28			93		7
		0,16	0,48		86	11		3

Примечание. Жирным шрифтом отмечены разложения на одну экспоненциальную функцию, курсивом – разложения на две экспоненты при допущении наличия компоненты с $\tau_1 \approx 400\text{--}500$ мкс. Предположительные соответствия компонент: 0 – прямой перенос электрона от A_{1A} к F_x , 1 – рекомбинация с A_1 , 2 – обратный перенос электрона от 4Fe4S-кластеров.

с $\tau = 280$ мкс и долгоживущей компонентой ($\tau > 10$ мс) (рис. 7). Отношение сигнал/шум в экспериментальных данных не позволяет с уверенностью выделить две ожидаемые экспоненты, как это наблюдалось в спектрофотометрических измерениях при комнатной температуре. Если, по аналогии с вышеописанной процедурой, произвести разложение кинетики на две экспоненты, одна из которых имеет $\tau_1 \approx 400\text{--}600$ мкс, то в сигнале A_1^- можно выделить более быструю субкомпоненту со временем $\tau_0 < 200$ мкс. Мы предполагаем, что так же, как и в препаратах F_x -core, наблюдаемый спад сигнала A_1^- является комбинацией двух процессов – сильно замедленного прямого переноса электрона от A_1^- на F_x (и, возможно, далее на F_A и F_B) с $\tau_0 < 200$ мкс и обратного переноса электрона от A_1^- на P_{700}^+ с $\tau_1 = 480$ мкс.

Кинетика сигнала P_{700}^+ хорошо описывается двумя компонентами с временами $\tau_1 = 480$ мкс и $\tau_2 = 5$ мс, а также долгоживущей компонентой ($\tau > 10$ мс). Аналогично ситуации с комплексами F_x -core мы предполагаем, что более быстрая компонента обусловлена рекомбинацией зарядов в ион-радикальной паре $P_{700}^+A_{1A}^-$, а более медленные – обратным переносом электрона от железосерных кластеров на P_{700}^+ .

Разложения кинетик ЭПР сигналов радикалов A_1^- и P_{700}^+ в трёх типах комплексов ФС 1 суммированы в табл. 2.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из экспериментальных данных, суммированных в табл. 2, можно сделать несколько выводов.

1) На препаратах A_1 -core кинетики спада ЭПР-сигналов P_{700}^+ и A_1^- имеют одинаковые характерные времена $\tau_1 \approx 500$ мкс. Это время близко к одной из компонент кинетики восстановления P_{700}^+ , приписываемой рекомбинации с филлохинона A_{1A} и измеренной спектрофотометрически при 100 К на аналогичных препаратах ФС 1, лишённых 4Fe4S-кластеров [27]. Более быстрая компонента рекомбинации с A_{1B} ($\tau \approx 25$ мкс), наблюдаемая в кинетике абсорбционных изменений, в сигнале ЭПР маскируется релаксацией неравновесной поляризации системы. Можно заключить, что в этих препаратах происходит только образование ион-радикальной пары $P_{700}^+A_1^-$ и обратный перенос электрона от A_1^- на P_{700}^+ .

2) На препаратах F_x -core в ЭПР-сигнале P_{700}^+ кинетика хорошо аппроксимируется одной экспонентой с $\tau = 720$ мкс, а в сигнале A_1^- – с $\tau = 350$ мкс. В отличие от данных, полученных на препаратах A_1 -core, эти сигналы не могут отражать одну и ту же реакцию переноса электрона. В то же время, если обе представленные кинетики описать как сумму двух экспоненциальных функций, то одна из них будет иметь $\tau_1 = 420$ мкс, что близко к наблюдаемой кинетике переноса электрона от A_1^- на P_{700}^+ ,

наблюдаемой на препарате A_1 -core. Вторая компонента в случае сигнала P_{700}^+ имеет $\tau_2 = 910$ мкс, а в случае $A_1^- - \tau_0 < 200$ мкс. Кинетика с $\tau_2 = 910$ мкс, вероятно, соответствует рекомбинации с $4Fe_4S$ -кластера F_x , а компонента с $\tau_0 < 200$ мкс может быть связана с замедлившимся при низкой температуре прямым переносом электрона от A_{1A} к F_x [13]. В кинетике восстановления P_{700}^+ по данным абсорбционной спектроскопии на таких же препаратах при 100 К наблюдалась быстрая компонента с $\tau = 410$ мкс и медленная гетерогенная компонента со средним значением $\tau = 104$ мс [1]; таким образом, миллисекундная компонента восстановления P_{700}^+ в сигнале ЭПР была на два порядка быстрее, чем в экспериментах по импульсной спектроскопии. Вероятно, это связано с тем, что в импульсной ЭПР-спектроскопии частота лазерных вспышек (10 Гц) существенно больше, чем в абсорбционной спектроскопии ($< 0,1$ Гц). В результате во фракции ФС 1, в которой рекомбинация происходит со временами $\tau > 1$ мс, накапливаются восстановленные $4Fe_4S$ -кластеры, с которых не происходит обратного переноса электрона. Таким образом, в наблюдаемой кинетике сигнала ЭПР наблюдается только рекомбинация с кластера F_x в конформации, обеспечивающей максимально возможную скорость этой реакции ($\tau_2 = 910$ мкс).

3) В нативных комплексах ФС 1, так же как и в комплексах F_x -core, кинетика сигнала P_{700}^+ существенно медленнее кинетики сигнала A_1^- . Аналогично вышеописанной процедуре для F_x -core, сигнал ЭПР A_1^- может быть представлен как сумма замедленной реакции прямого переноса электрона с $\tau_0 < 200$ мкс (определение амплитуды которой затруднено из-за релаксации неравновесной поляризации системы) и обратного переноса с A_{1A} с $\tau_1 = 480$ мкс. В сигнале P_{700}^+ можно выделить компоненту рекомбинации с A_{1A} с такой же кинетикой $\tau_1 = 480$ мкс и более медленные компоненты рекомбинации с $4Fe_4S$ -кластерами. Общая амплитуда последних ($\tau_2 = 5$ мс и неразрешаемые по времени долгоживущие субкомпоненты) составляет 34%, что хорошо согласуется со вкладом рекомбинации с $4Fe_4S$ -кластерами при 100 К по данным импульсной абсорбционной спектроскопии [1]. Так же, как и в F_x -core-комплексах, медленная компонента восстановления P_{700}^+ существенно быстрее в сигнале ЭПР, чем в кинетике абсорбционных изменений на длине волны 820 нм; вероятная причина этого изложена выше.

Сопоставление кинетики изменения сигналов ЭПР P_{700}^+ и A_1^- на трёх препаратах комплексов ФС 1, содержащих различное число $4Fe_4S$ -кластеров, впервые позволяет разделить прямые и обратные реакции переноса электрона с участием филлохинона A_1^- и оценить соотношение этих

реакций при криогенных температурах. Одновременное измерение ЭПР-сигналов двух редокс-кофакторов демонстрирует кинетику обратного переноса электрона от A_1^- на P_{700}^+ в нативных комплексах ФС 1. В отличие от косвенных измерений по каротиноидному сдвигу, измерение сигнала ЭПР A_1^- позволяет прямо регистрировать кинетику редокс-превращений A_1^- , в том числе в нативных комплексах ФС 1. В настоящей работе данный метод позволял регистрировать кинетику спада сигналов ЭПР в диапазоне от ~ 200 мкс до 10 мс, ограниченном релаксацией неравновесной поляризации системы на быстрых временах, а также уменьшением соотношения сигнал/шум и деградацией образца – на медленных.

Временное разрешение метода можно улучшить при повышении температуры, что позволяет существенно ускорить релаксацию неравновесной поляризации системы. В водно-глицериновой смеси измерения при более высоких температурах затруднены, однако ранее было показано, что высушивание комплексов ФС 1 в дегидратированных трегалозных матрицах даёт возможность измерять сигнал ЭПР при температурах вплоть до комнатных [17, 18]: в таких измерениях временное разрешение составляло ~ 10 мкс. Доступный временной диапазон можно расширить на времена свыше 10 мс при использовании метода измерения сигнала ЭПР в W-диапазоне в ответ на единичные вспышки [18].

Вклад авторов. А.Ю. Семёнов – концепция и руководство работой; Л.А. Витухновская, М.Д. Мамедов – получение образцов; А.Н. Суханов, К.М. Салихов – получение кинетик спектров ЭПР; А.Н. Суханов, Г.Е. Милановский – анализ результатов; Г.Е. Милановский, А.Ю. Семёнов – написание текста; все авторы принимали участие в обсуждении результатов.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 23-74-00025).

Благодарности. Авторы приносят благодарность недавно ушедшему из жизни проф. Клаусу Мёбиусу (Freie Universität Berlin, Германия) за ценное обсуждение результатов и Аиде Мамедовой (НИИ ФХБ МГУ, Москва) за помощь в выделении образцов ФС 1.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

Дополнительные материалы. Приложение к статье опубликовано на сайте журнала «Биохимия» (<https://biochemistry.moscow.com>).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Milanovsky, G., Gupta, O., Petrova, A., Mamedov, M., Gorka, M., Cherepanov, D., Golbeck, J. H., and Semenov, A. (2019) Multiple pathways of charge recombination revealed by the temperature dependence of electron transfer kinetics in cyanobacterial photosystem I, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1860**, 601-610, <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2019.06.008>.
2. Brettel, K. (1997) Electron transfer and arrangement of the redox cofactors in photosystem I, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1318**, 322-373, [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(96\)00112-0](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(96)00112-0).
3. Brettel, K., and Leibl, W. (2001) Electron transfer in photosystem I, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1507**, 100-114, [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(01\)00202-X](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(01)00202-X).
4. Golbeck, J. H. (2006) *Photosystem I. The Light-Driven Plastocyanin: Ferredoxin Oxidoreductase*, Springer Netherlands, Dordrecht, <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4256-0>.
5. Fromme, P., Jordan, P., and Krauß, N. (2001) Structure of photosystem I, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1507**, 5-31, [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(01\)00195-5](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(01)00195-5).
6. Shelaev, I. V., Gostev, F. E., Mamedov, M. D., Sarkisov, O. M., Nadtochenko, V. A., Shuvalov, V. A., and Semenov, A. Y. (2010) Femtosecond primary charge separation in *Synechocystis* sp. PCC 6803 photosystem I, *Biochim. Biophys. Acta*, **1797**, 1410-1420, <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.02.026>.
7. Cherepanov, D. A., Shelaev, I. V., Gostev, F. E., Petrova, A., Aybush, A. V., Nadtochenko, V. A., Xu, W., Golbeck, J. H., and Semenov, A. Y. (2021) Primary charge separation within the structurally symmetric tetrameric Chl_{2A}P_AP_BChl_{2B} chlorophyll exciplex in photosystem I, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, **217**, 112154, <https://doi.org/10.1016/J.JPHOTOBIO.2021.112154>.
8. Brettel, K., and Vos, M. H. (1999) Spectroscopic resolution of the picosecond reduction kinetics of the secondary electron acceptor A₁ in photosystem I, *FEBS Lett.*, **447**, 315-317, [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)00317-8](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)00317-8).
9. Savikhin, S., Xu, W., Martinsson, P., Chitnis, P. R., and Struve, W. S. (2001) Kinetics of charge separation and A₀⁻→A₁ electron transfer in photosystem I reaction centers, *Biochemistry*, **40**, 9282-9290, <https://doi.org/10.1021/bi0104165>.
10. Joliot, P., and Joliot, A. (1999) *In vivo* analysis of the electron transfer within photosystem I: are the two phyloquinones involved? *Biochemistry*, **38**, 11130-11136, <https://doi.org/10.1021/bi990857c>.
11. Guergova-Kuras, M., Boudreaux, B., Joliot, A., Joliot, P., and Redding, K. (2001) Evidence for two active branches for electron transfer in photosystem I, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 4437-4442, <https://doi.org/10.1073/pnas.081078898>.
12. Muhiuddin, I. P., Heathcote, P., Carter, S., Purton, S., Rigby, S. E. J., and Evans, M. C. W. (2001) Evidence from time resolved studies of the P700⁺/A₁⁻ radical pair for photosynthetic electron transfer on both the PsaA and PsaB branches of the photosystem I reaction centre, *FEBS Lett.*, **503**, 56-60, [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02696-5](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02696-5).
13. Schlodder, E., Falkenberg, K., Gergeleit, M., and Brettel, K. (1998) Temperature dependence of forward and reverse electron transfer from A₁⁻, the reduced secondary electron acceptor in photosystem I, *Biochemistry*, **37**, 9466-9476, <https://doi.org/10.1021/bi973182r>.
14. Brettel, K., and Golbeck, J. H. (1995) Spectral and kinetic characterization of electron acceptor A₁ in a Photosystem I core devoid of iron-sulfur centers F_X, F_B and F_A, *Photosynth. Res.*, **45**, 183-193, <https://doi.org/10.1007/BF00015559>.
15. Möbius, K., and Savitsky, A. (2008) *High-Field EPR Spectroscopy on Proteins and their Model Systems*, Royal Society of Chemistry, Cambridge, <https://doi.org/10.1039/9781847559272>.
16. Savitsky, A., Gupta, O., Mamedov, M., Golbeck, J. H., Tikhonov, A., Möbius, K., and Semenov, A. (2010) Alteration of the axial met ligand to electron acceptor A₀ in photosystem I: effect on the generation of P 700⁺A₁ – radical pairs as studied by W-band transient EPR, *Appl. Magn. Reson.*, **37**, 85-102, <https://doi.org/10.1007/s00723-009-0052-0>.
17. Malferrari, M., Savitsky, A., Mamedov, M. D., Milanovsky, G. E., Lubitz, W., Möbius, K., Semenov, A. Y., and Venturoli, G. (2016) Trehalose matrix effects on charge-recombination kinetics in Photosystem I of oxygenic photosynthesis at different dehydration levels, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1857**, 1440-1454, <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2016.05.001>.
18. Shelaev, I., Gorka, M., Savitsky, A., Kurashov, V., Mamedov, M., Gostev, F., Möbius, K., Nadtochenko, V., Golbeck, J., and Semenov, A. (2017) Effect of dehydrated trehalose matrix on the kinetics of forward electron transfer reactions in photosystem I, *Zeitschrift Phys. Chemie*, **231**, 325-345, <https://doi.org/10.1515/zpch-2016-0860>.
19. Poluektov, O. G., Paschenko, S. V., Utschig, L. M., Lakshmi, K. V., and Thurnauer, M. C. (2005) Bidirectional electron transfer in photosystem I: direct evidence from high-frequency time-resolved EPR spectroscopy, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 11910-11911, <https://doi.org/10.1021/ja053315t>.

20. Poluektov, O. G., and Utschig, L. M. (2015) Directionality of electron transfer in type I reaction center proteins: high-frequency EPR study of PS I with removed iron-sulfur centers, *J. Phys. Chem. B*, **119**, 13771-13776, <https://doi.org/10.1021/ACS.JPCB.5B04063>.
21. Rippka, R., Deruelles, J., Waterbury, J. B., Herdman, M., and Stanier, R. Y. (1979) Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyano-bacteria, *J. Gen. Microbiol.*, **11**, 1-61, <https://doi.org/10.1099/00221287-111-1-1>.
22. Shen, G., Zhao, J., Reimer, S. K., Antonkine, M. L., Cai, Q., Weiland, S. M., Golbeck, J. H., and Bryant, D. A. (2002) Assembly of photosystem I. I. Inactivation of the *rubA* gene encoding a membrane-associated rubredoxin in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002 causes a loss of photosystem I activity, *J. Biol. Chem.*, **277**, 20343-20354, <https://doi.org/10.1074/jbc.M201103200>.
23. Mula, S., Savitsky, A., Möbius, K., Lubitz, W., Golbeck, J. H., Mamedov, M. D., Semenov A. Y., and van der Est, A. (2012) Incorporation of a high potential quinone reveals that electron transfer in Photosystem I becomes highly asymmetric at low temperature, *Photochem. Photobiol. Sci.*, **11**, 946, <https://doi.org/10.1039/c2pp05340c>.
24. MATLAB: 9.14.0, The MathWorks Inc., Natick, Massachusetts (2023) URL: <https://www.mathworks.com/>.
25. Vassiliev, I. R., Jung, Y. S., Mamedov, M. D., Semenov, A. Yu., and Golbeck, J. H. (1997) Near-IR absorbance changes and electrogenic reactions in the microsecond-to-second time domain in Photosystem I, *Biophys. J.*, **72**, 301-315, [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(97\)78669-7](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(97)78669-7).
26. Shen, G., Antonkine, M. L., van der Est, A., Vassiliev, I. R., Brettel, K., Bittl, R., Zech, S. G., Zhao, J., Stehlik, D., Bryant, D. A., and Golbeck, J. H. (2002) Assembly of photosystem I. II. Rubredoxin is required for the *in vivo* assembly of F(X) in *Synechococcus* sp. PCC 7002 as shown by optical and EPR spectroscopy, *J. Biol. Chem.*, **277**, 20355-20366, <https://doi.org/10.1074/jbc.M201104200>.
27. Cherepanov, D. A., Milanovsky, G. E., Gupta, O. A., Balasubramanian, R., Bryant, D. A., Semenov, A. Y., and Golbeck, J. H. (2018) Electron-phonon coupling in cyanobacterial photosystem I, *J. Phys. Chem. B*, **122**, 7943-7955, <https://doi.org/10.1021/acs.jpcb.8b03906>.
28. Salikhov, K. M., Kandrashkin, Y. E., and Salikhov, A. K. (1992) Peculiarities of free induction and primary spin echo signals for spin-correlated radical pairs, *Appl. Magn. Reson.*, **3**, 199-216, <https://doi.org/10.1007/BF03166790>.
29. Salikhov, K. M., Sukhanov, A. A., and Khairutdinov, I. T. (2024) Features of the primary electron spin echo signal for spin-correlated radical pairs, *Appl. Magn. Reson.*, **55**, 463-475, <https://doi.org/10.1007/s00723-023-01636-6>.
30. Salikhov, K. M., Molin, Y. N., Sagdeev, R. Z., and Buchachenko, A. L. (1984) Spin polarization and magnetic effects in radical reactions, in *Studies in Physical and Theoretical Chemistry*, Elsevier, Amsterdam, Netherlands.

KINETICS OF ELECTRON TRANSFER BETWEEN REDOX COFACTORS IN PHOTOSYSTEM I MEASURED BY HIGH-FREQUENCY EPR SPECTROSCOPY

**A. A. Sukhanov¹, G. E. Milanovsky^{2*}, L. A. Vitukhnovskaya^{2,3}, M. D. Mamedov²,
K. M. Salikhov¹ and A. Yu. Semenov^{2*}**

¹ FRC Kazan Scientific Center, Zavoisky Physical-Technical Institute, Russian Academy of Sciences,
420111 Kazan, Russia

² A. N. Belozersky Research Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University,
119992 Moscow, Russia; e-mail: milanovsky@belozersky.msu.ru, semenov@belozersky.msu.ru

³ N. N. Semenov Federal Research Center for Chemical Physics, Russian Academy of Sciences,
119991 Moscow, Russia

Using high-frequency pulsed EPR spectroscopy in the Q range at cryogenic temperatures, the kinetics of redox transformations of the primary electron donor P_{700}^+ and the quinone acceptor A_1^- in various complexes of photosystem I (PSI) from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 were simultaneously studied for the first time in the time range of 200 μ s-10 ms. In the A_1 -core complexes of PSI that lack 4Fe4S clusters, the kinetics of the A_1^- and P_{700}^+ signals decay at a temperature of 100 K coincided and had a characteristic time of $\tau \approx 500 \mu$ s, caused by charge recombination in the $P_{700}^+A_1A$ ion-radical pair in the A branch of redox cofactors. The kinetics of the reverse electron transfer from A_1B^- to P_{700}^+ in the B branch of redox cofactors with $\tau < 100 \mu$ s could not be recorded due to

the time limitations of the method. In the native PSI complexes comprising a full set of redox cofactors and in the F_x -core complexes with the 4Fe4S cluster F_x only the kinetics of the A_1^- signal was significantly faster than that of the P_{700}^+ signal. The disappearance of the A_1^- signal had a characteristic time of 280-350 μ s. It was suggested that, in addition to the reverse electron transfer from A_{1A}^- to P_{700}^+ with $\tau \approx 500$ μ s, it also includes a slowed down (up to 150-200 μ s) forward electron transfer from A_{1A}^- to the 4Fe4S cluster F_x . In the kinetics of P_{700}^+ reduction, it was possible to distinguish components caused by the reverse electron transfer from A_1^- ($\tau \approx 500$ μ s) and from 4Fe4S clusters ($\tau = 1$ ms for the F_x -core and $\tau > 5$ ms for native complexes). These results are in qualitative agreement with the data on the kinetics of P_{700}^+ reduction obtained earlier using pulsed absorption spectrometry at cryogenic temperatures.

Keywords: photosystem I, kinetics of EPR spectra, low temperature measurements, forward and backward electron transfer, F_x -core, A_1 -core