

ИЗМЕНЕНИЕ СИММЕТРИИ ПЕРЕНОСА ЭЛЕКТРОНА В РЕАКЦИОННЫХ ЦЕНТРАХ ФОТОСИСТЕМЫ 1 ПРИ УДАЛЕНИИ ЖЕЛЕЗО-СЕРНЫХ КЛАСТЕРОВ

© 2022 А.А. Суханов¹, М.Д. Мамедов², Г.Е. Милановский²,
К.М. Салихов¹, А.Ю. Семенов^{2*}

¹ Казанский физико-технический институт им. Е.К. Завойского, ФИЦ Казанский научный центр РАН,
420029 Казань, Россия

² НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
119234 Москва, Россия; электронная почта: semenov@belozersky.msu.ru

Поступила в редакцию 04.07.2022

После доработки 09.08.2022

Принята к публикации 16.08.2022

В фотосинтетических реакционных центрах интактных комплексов фотосистемы 1 (ФС 1) из цианобактерий перенос электронов при комнатной температуре происходит по двум симметричным ветвям редокс-кофакторов *A* и *B* в соотношении ~3 : 1 в пользу ветви *A*. Ранее это было косвенно показано с помощью импульсной абсорбционной спектроскопии и более прямо — с помощью измерения частот модуляции спада сигналов электронного спинового эха (Electron Spin Echo Envelope Modulation, ESEEM), которое позволяет определить расстояние между разделёнными зарядами на первичном доноре электрона P_{700}^+ и филлохионных акцепторах A_{1A} и A_{1B} в ветвях кофакторов *A* и *B*. В настоящей работе эти расстояния с помощью ESEEM были определены на комплексах ФС 1, лишённых трёх 4Fe-4S кластеров — F_X , F_A и F_B , а также белковой субъединицы PsaC (так называемые P_{700} - A_1 -core), в которых терминальными акцепторами служат молекулы филлохинона A_{1A} и A_{1B} . Было показано, что на препаратах P_{700} - A_1 -core среднее расстояние между центрами ион-радикальной пары $P_{700}^+A_1^-$ при температуре 150 К в водно-глицериновом растворе и в высушенной трегалозной матрице, а также в трегалозной матрице при температуре 280 К составляет ~25,5 Å, что соответствует симметричному переносу электрона по ветвям редокс-кофакторов *A* и *B* в соотношении 1 : 1. Обсуждаются возможные причины изменения симметрии переноса электрона в ФС 1 при удалении субъединицы PsaC и 4Fe-4S кластеров F_X , F_A , F_B .

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: фотосистема 1, перенос электрона, модуляция спада сигналов электронного спинового эха (ESEEM), трегалозная матрица, железо-серные кластеры.

DOI: 10.31857/S0320972522100062, EDN: BCCHBW

ВВЕДЕНИЕ

Реакционный центр (РЦ) фотосистемы 1 (ФС 1) цианобактерий и зелёных растений содержит 11 редокс-кофакторов, включая шесть молекул хлорофилла (Хл), две молекулы филлохинона (PhQ) и три железо-серных центра 4Fe-4S типа — F_X , F_A и F_B [1]. Индуцированный лазерной вспышкой, перенос электрона включает окисление первичного донора электро-

на — димера хлорофилла P_{700} , последовательный перенос через первичный хлорофилльный акцептор A_0 на филлохионные акцепторы A_1 и 4Fe-4S кластеры F_X , F_A и F_B [2]. В отсутствие экзогенных акцепторов электрона в РЦ ФС 1 наблюдается рекомбинация зарядов между восстановленными терминальными 4Fe-4S кластерами $[F_A/F_B]^-$ и окисленным донором P_{700}^+ . Ранее было показано, что при последовательном удалении из ФС 1 кластеров F_B , F_A и F_X об-

Принятые сокращения: РЦ — реакционный центр; ФС 1 — фотосистема 1; Хл — хлорофилл; A_1 — филлохион — вторичный акцептор электрона; E_m — среднеточечный редокс-потенциал; ESEEM — метод измерения частот модуляции спада сигналов электронного спинового эха (Electron Spin Echo Envelope Modulation); P_{700} — димер хлорофилла — первичный донор электрона; PhQ — филлохион.

* Адресат для корреспонденции.

ратный перенос электрона на P_{700}^+ происходит с предыдущих акцепторов – F_A , F_X и A_1 соответственно [3–5].

Комплекс ФС 1 из цианобактерий состоит из 12 белковых субъединиц, из которых только три ($PsaA$, $PsaB$ и $PsaC$) связывают все кофакторы переноса электрона. Эти субъединицы связывают также 79 из 90 молекул Хл светособирающей антенны. При этом субъединицы $PsaA$ и $PsaB$ являются центральной частью комплекса, образуют гетеродимер и связывают шесть молекул Хл РЦ, две молекулы PhQ и 4Fe-4S кластер F_X , а субъединица $PsaC$, примыкающая к акцепторному участку гетеродимера $PsaA/PsaB$, связывает терминальные железо-серные кластеры F_A и F_B . Редокс-кофакторы, связанные с $PsaA/PsaB$, расположены вдоль C_2 оси симметрии, проходящей через геометрический центр димера Хл P_{700} и кластер F_X , и образуют две симметричные ветви A и B [1, 3]. Таким образом, ветвь A содержит первичный акцептор A_{0A} (состоящий из молекул Хл $Chl2A$ и $Chl3A$) и молекулу PhQ A_{1A} , а ветвь B – первичный акцептор A_{0B} (состоящий из молекул Хл $Chl2B$ и $Chl3B$) и молекулу PhQ A_{1B} . Перенос электронов происходит по обеим ветвям и начинается с окисления P_{700} , а заканчивается на F_X , где ветви смыкаются, и осуществляется дальнейший перенос на терминальные акцепторы [F_A/F_B] (рис. 1, *a*).

Вопрос о причинах участия обеих ветвей редокс-кофакторов в переносе электрона в РЦ ФС 1 не вполне выяснен [3]. В двух других из-

ученных типах РЦ – комплексах ФС 2 и бактериальных РЦ – у которых также имеются две симметричные ветви кофакторов, аналогичные ветвям A и B , перенос происходит только по одной ветви на первичный хинонный акцептор Q_A , а затем с Q_A^- на вторичный акцептор Q_B с образованием стабильного семихинона Q_B^- . При возбуждении таких РЦ второй вспышкой света наблюдается полное восстановление Q_B^- с образованием протонированного вторичного хинона Q_BH_2 , который, в свою очередь, окисляется цитохромным bc_1 -комплексом (b_6f в случае ФС 2). В то же время в ФС 1 перенос электрона происходит с молекул PhQ A_{1A} и A_{1B} на железо-серный кластер F_X , а переноса между молекулами PhQ A_{1A} и A_{1B} не происходит. Можно предположить, что возможность переноса по обеим ветвям редокс-кофакторов в ФС 1 является эволюционным приспособлением, позволяющим сохранить эффективное восстановление низкопотенциальных акцепторов электрона – ферредоксина и NADP – при случайных мутациях вблизи первичных акцепторов одной из ветвей редокс-кофакторов.

Перенос электронов в РЦ ФС 1 цианобактерий по ветвям A и B происходит асимметрично в соотношении $\sim 3 : 1$ в пользу ветви A [6]. При этом перенос с A_{0A} на A_{1A} и с A_{0B} на A_{1B} происходит с одинаковым характерным временем $\tau \approx 25$ пс, а перенос с A_{1A} на F_X – примерно на порядок медленнее, чем с A_{1B} на F_X ($\tau \approx 200$ нс против $\tau \approx 20$ нс, соответственно) [7–9]. Разница в скоростях реакций $A_{1A} \rightarrow F_X$ и $A_{1B} \rightarrow F_X$

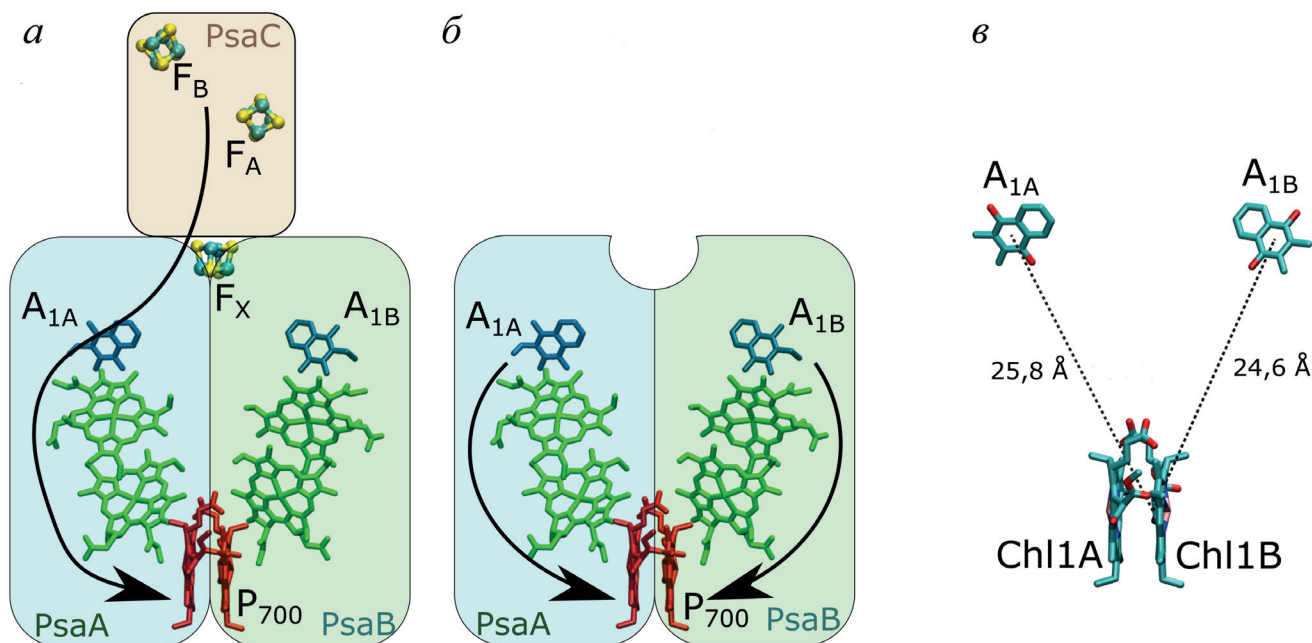


Рис. 1. Структура РЦ комплекса фотосистемы 1. Показаны интактный комплекс P_{700} - F_A/F_B (*a*), комплекс P_{700} - A_1 -core, лишённый 4Fe-4S кластеров и субъединицы $PsaC$ (*б*), и расстояния между центрами спиновой плотности P_{700} и A_{1A}/A_{1B} (*в*). Стрелками показаны пути рекомбинации электрона

в основном обусловлена разницей в значениях свободных энергий этих реакций ΔG , поскольку средноточечные редокс-потенциалы (E_m) A_{1A} и A_{1B} различаются примерно на 150 мВ [10, 11]. Возможно, что аналогичным образом на препаратах, лишённых 4Fe-4S кластеров (P_{700} - A_1 -core, рис. 1, б), вследствие разницы между значениями ΔG обратных реакций переноса электрона в реакциях $A_{1A}^- \rightarrow P_{700}^+$ и $A_{1B}^- \rightarrow P_{700}^+$ различаются кинетики рекомбинации зарядов в ион-радикальных парах $P_{700}^+A_{1B}^-$ и $P_{700}^+A_{1A}^-$ ($\tau \approx 20$ мкс против $\tau \approx 200$ мкс соответственно) [5, 12]. Однако следует отметить, что удаление белковой субъединицы PsaC и железо-серных кластеров может приводить к изменению значений E_m для A_{1A} и A_{1B} . Поскольку отрицательно заряженные кластеры F_A и F_B расположены асимметрично по отношению к филлохинонам A_{1A} и A_{1B} , то удаление этих кластеров должно приводить к уменьшению разницы между редокс-потенциалами A_{1A} и A_{1B} [10, 13].

Вопрос о степени асимметрии переноса электронов по ветвям редокс-кофакторов в ФС 1 продолжает оставаться предметом дискуссий (см. обзор [3]). Как было показано в работах Plato et al., центр спиновой плотности между мономерами *Chl1A* и *Chl1B* в димере P_{700} существенно смещён в сторону *Chl1B* [14, 15]; в результате расстояния между центрами спиновой плотности ион-радикальных пар $P_{700}^+A_{1A}^-$ и $P_{700}^+A_{1B}^-$ неодинаковы и составляют ~ 26 Å и ~ 25 Å соответственно (рис. 1, в). Ранее с помощью ЭПР-спектроскопии методом измерения частот модуляции спада сигналов электронного спинового эха (Electron Spin Echo Envelope Modulation, ESEEM) было показано, что при криогенных температурах в интактных комплексах ФС 1 из цианобактерий (P_{700} - F_A/F_B) измеренное расстояние между центрами спиновой плотности в ион-радикальной паре $P_{700}^+A_1^-$ (~ 26 Å) соответствует переносу электрона по ветви *A* [16, 17]. Такое же расстояние было зарегистрировано при исследовании с помощью ESEEM препаратов ФС 1, выделенных из мутантного штамма *menB* и содержащих в сайтах связывания A_{1A} и A_{1B} высокопотенциальное производное хинона – 2,3-дихлорнафтохинон. В этих комплексах перенос электронов на 4Fe-4S кластеры не наблюдался по термодинамическим причинам, и рекомбинация зарядов происходила между A_1^- и P_{700}^+ [16]. При этом измеренное расстояние между P_{700}^+ и A_1^- также составляло ~ 26 Å, что соответствовало преимущественному переносу электрона по ветви *A*.

Другим способом определения степени асимметрии переноса электрона по ветвям редокс-кофакторов *A* и *B* является измерение со-

отношения амплитуд кинетических компонент, соответствующих прямому переносу электрона от A_{1A}^- и от A_{1B}^- на F_x . С помощью измерения электрохромного сдвига полосы поглощения каротиноидов было показано, что это соотношение составляет 2 : 1 в пользу ветви *A* [18]. Однако молекулы каротиноидов в РЦ ФС 1 по-разному ориентированы относительно молекул PhQ в сайтах A_{1A} и A_{1B} . На комплексах P_{700} - A_1 -core были исследованы вклады кинетических компонент, обусловленных рекомбинацией зарядов в ион-радикальных парах $P_{700}^+A_{1A}^-$ и $P_{700}^+A_{1B}^-$, с одной стороны, и спадом электрохромного каротиноидного сдвига – с другой. Сопоставление относительных амплитуд этих кинетических компонент показало, что вклад переноса по ветви *A* занижен в 2,33 раза по сравнению со вкладом переноса по ветви *B* [19]. С учётом этого коэффициента соотношение прямого переноса электрона по ветвям редокс-кофакторов должно составлять ~ 4 : 1 в пользу ветви *A*. Поскольку в комплексах P_{700} - F_A/F_B рекомбинация зарядов с молекул PhQ не наблюдается, то о кинетике обратного переноса электрона от A_{1A}^- и A_{1B}^- на P_{700}^+ можно судить только в случае прекращения прямого переноса на железо-серные кластеры. Частичное прекращение прямого переноса электрона от A_1 на 4Fe-4S кластеры наблюдается при понижении температуры и при высушивании в трегалозной стекловидной матрице [20–22]. Однако при комнатной температуре в растворе рекомбинацию зарядов в ион-радикальных парах $P_{700}^+A_{1A}^-$ и $P_{700}^+A_{1B}^-$ можно регистрировать только на препаратах P_{700} - A_1 -core.

Исследование температурной зависимости кинетики рекомбинации зарядов между A_1^- и P_{700}^+ на препаратах P_{700} - A_1 -core методом импульсной абсорбционной спектроскопии показало, что при температуре 300 К соотношение вкладов кинетических компонент обратного переноса электрона от восстановленных акцепторов A_{1A}^- и A_{1B}^- на P_{700}^+ составляет ~ 60 : 40 в пользу ветви *A*. При понижении температуры до 150 К эти вклады становятся практически равными (50 : 50) [12].

Измерение расстояний между центрами спиновой плотности в ион-радикальных парах $P_{700}^+A_1^-$ проводилось при криогенных температурах в водно-глицериновых растворах. При температурах выше 200 К импульсная ЭПР-спектроскопия не могла быть надёжно применена из-за быстрой спиновой релаксации. Однако, высушивание препаратов ФС 1 в стекловидной трегалозной матрице замедляет спиновую релаксацию и позволяет регистрировать образование ион-радикальных пар $P_{700}^+A_1^-$ с помо-

шью высокочастотной ЭПР-спектроскопии в полосах W и Q, а также определять расстояние между центрами спиновой плотности в этих парах с помощью ESEEM [17, 23, 24]. Ранее методы высокочастотной ЭПР-спектроскопии и ESEEM были применены для исследования спин-коррелированной радикальной пары $P_{870}^+Q_A^-$ в бактериальных РЦ в высушенной трегалозной матрице при 150 К и при комнатной температуре [25]. Было показано, что высушивание этих препаратов в трегалозной матрице не приводит к изменению молекулярной конфигурации радикальной пары $P_{870}^+Q_A^-$. Можно предполагать, что измерения расстояний между центрами спиновой плотности ион-радикальных пар возможны и для других пигмент-белковых комплексов в высушенной трегалозной матрице при комнатной температуре. Применение дегидратированных трегалозных матриц для длительного сохранения активности различных белковых комплексов при комнатной температуре подробно обсуждено в обзоре Möbius et al. [26].

Недавно расстояние между P_{700}^+ и A_1^- было измерено нами для комплексов $P_{700}-F_A/F_B$ в высушенной трегалозной матрице при криогенной и комнатной температурах [23]. Было показано, что при температурах 150 К и 220 К расстояние составляет ~ 26 Å, а при температуре 280 К оно увеличивается до ~ 27 Å. Однако кажущееся увеличение расстояния в этих условиях, основанное на уменьшении частоты модуляции сигнала ESEEM, было объяснено ускорением спин-решёточной релаксации A_1^- от 3 до 1 мкс вследствие влияния ионов железа 4Fe-4S кластеров. Таким образом, был сделан вывод о том, что расстояние между центрами спиновой плотности пары $P_{700}^+A_1^-$ в трегалозной матрице при комнатной температуре остаётся неизменным и соответствует преимущественному переносу электрона по ветви А.

В другой нашей работе метод ESEEM был применён для определения расстояния между P_{700}^+ и A_1^- в комплексах ФС 1, лишённых субъединицы PsaC и терминальных 4Fe-4S кластеров F_A/F_B (комплексы $P_{700}-F_X$ -core). Полученные данные показали, что это расстояние в высушенной трегалозной матрице (~ 25 Å) соответствует преимущественному переносу электрона по ветви В [24].

В настоящей работе была предпринята попытка измерить расстояние между P_{700}^+ и A_1^- в комплексах ФС 1 $P_{700}-A_1$ -core в водно-глицериновом растворе и в высушенной трегалозной матрице при криогенных температурах, а также в трегалозной матрице при температуре 280 К.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение препаратов $P_{700}-A_1$ -core. Тримерные комплексы ФС 1 были выделены из цианобактерий *Synechocystis* sp. PCC 6803 [27] путём обработки тилакоидных мембран додецил- β -D-мальтозидом с последующим центрифугированием в градиенте плотности сахарозы (5–20%) при 210 000 g в течение 3 ч с использованием ротора VTi 50 («Beckman Coulter», США), полученного при поддержке Программы развития Московского университета. Для получения комплексов ФС 1 с удалёнными железо-серными кластерами $F_X/F_A/F_B$ ($P_{700}-A_1$ -core, см. рис. 1, б) интактные комплексы ФС 1 из *Synechocystis* sp. PCC 6803 сначала инкубировали в среде, содержащей 50 мМ Tris-HCl (pH 8,0) и 6,8 М мочевины, в течение 90 мин при комнатной температуре в темноте. При этом конечная концентрация детергента не превышала $\sim 0,05\%$ (w/v). Для полного удаления мочевины суспензию ФС 1 промывали буфером 50 мМ Tris-HCl (pH 8,0) до концентрации мочевины $\sim 0,03\%$. После концентрирования суспензии концентрация Хл в ФС 1 составила ~ 2 мг Хл/мл, на данном этапе происходило удаление терминальных кластеров F_A/F_B .

Полученные препараты затем инкубировали в среде, содержащей 50 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 3,4 М мочевины и 5 мМ феррицианида калия, в течение 2 ч при комнатной температуре в темноте. Для полного удаления мочевины и феррицианида суспензию ФС 1 многократно промывали буфером, содержащим 50 мМ Tris-HCl (pH 8,0). Конечная концентрация мочевины и феррицианида составляла $\sim 0,03\%$ и $\sim 0,005\%$ (m/V) соответственно. После концентрирования суспензии $P_{700}-A_1$ -core концентрация Хл в РЦ составила $\sim 1,5$ мг Хл/мл (см. [28] и ссылки в ней для методики).

Для получения трегалозных матриц полученный раствор комплексов ФС 1 с трегалозой в молярном соотношении 1 : 40 000 высушивался в присутствии насыщенных водных растворов соли LiCl [21]; в этих условиях достигается относительная влажность воздуха 11% над раствором соли. При высушивании раствора комплексов ФС 1 в течение 14 суток в эксикаторе с насыщенным раствором LiCl достигается равновесие между белком в трегалозном матриксе и воздушными парами. Водно-глицериновые растворы комплексов содержали 50% глицерина от общего объёма.

ESEEM комплексов $P_{700}-A_1$ -core. Для нахождения расстояния между разделёнными зарядами в РЦ использовался импульсный метод так называемого первичного электронного спино-

вого эха. Измерения проводились в Q-диапазоне частот (34,03 ГГц) на ЭПР-спектрометре Elexsys E580 («Bruker», США) с использованием резонатора EN 5107D2, который имеет окно для фотовозбуждения, что позволяет подвести лазерный пучок непосредственно к образцу. Использовался азотный криостат ER 4131VT («Bruker»); для фотовозбуждения использовался YAG:Nd³⁺ лазер («Quantel Brilliant B», США, Франция) с длиной волны 532 нм, энергией 1 мДж и частотой повторения 10 Гц. Использовались кварцевые капилляры с внешним диаметром 1,2 мм и внутренним диаметром 1 мм, запаянные с одной стороны. Высушенные трегалозные матрицы помещались в капилляры в атмосфере инертного газа. Протокол эксперимента показан на рис. 2 и более подробно описан в работе [23]. Фурье-преобразование полученных сигналов выполнялось в программном пакете Херг («Bruker») по алгоритму быстрого Фурье-преобразования.

Лазерный импульс индуцирует разделение зарядов в РЦ ФС 1. После некоторой задержки последовательность двух СВЧ-импульсов формирует сигнал первичного электронного спинового эха. Регистрируется зависимость амплитуды сигнала эха в зависимости от интервала времени τ между двумя СВЧ-импульсами. Длительность СВЧ $\pi/2$ -импульса составляла 40 нс. В эксперименте проявляется модуляция огибающей спада сигналов эха (ESEEM). Этот эффект модуляции вызван спин-спиновым диполь-дипольным взаимодействием между разделёнными зарядами $P_{700}^+A_1^-$ в РЦ ФС 1 [29]. Частота наблюдаемой модуляции равна частоте спин-спинового диполь-дипольного взаимо-

действия разделённых зарядов, которая определяется как:

$$\omega_{d-d} = \frac{g_1 g_2 \beta^2 (1 - 3 \cos^2 \theta) r^3}{\hbar}, \quad (1)$$

где r – расстояние между разделёнными зарядами, g_1, g_2 – g-факторы разделённых зарядов, β – магнетон Бора, \hbar – постоянная Планка, θ – угол между радиус-вектором r и направлением вектора индукции постоянного магнитного поля B_0 .

Из уравнения (1) видно, что в зависимости от угла θ дипольная частота принимает разные значения с определённым распределением. Наибольший статистический вес имеют ориентации вектора r с $\theta = \pi/2$, т.е. наибольший вклад в наблюдаемую модуляцию сигнала эха дают РЦ с $\theta = \pi/2$, для которых дипольная частота равна:

$$\Omega = \frac{g_1 g_2 \beta^2}{r^3}. \quad (2)$$

Спектр ЭПР спин-коррелированной пары $P_{700}^+A_1^-$, полученный интегрированием сигнала эха с фиксированным значением $\tau = 300$ нс, показан на рис. 3. Измерения сигналов ESEEM проводились для резонансного значения магнитного поля, соответствующего сигналу от P_{700}^+ ион-радикальной пары $P_{700}^+A_1^-$. Модуляция сигнала наблюдалась только для одной компоненты намагниченности сигнала эха [30].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

На рис. 4 приведены ESEEM-сигналы комплексов $P_{700}^+A_1^-$ -core ФС 1 при комнатной и криогенной температурах, а на рис. 5 показаны соответствующие Фурье-спектры.

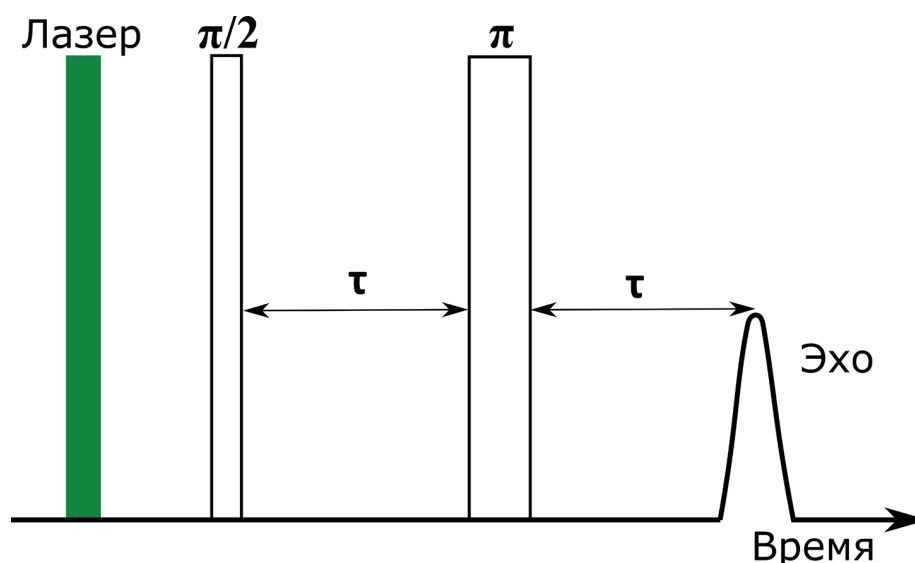


Рис. 2. Протокол эксперимента для измерения частоты модуляции сигнала первичного спинового эха, вызванной диполь-дипольным взаимодействием ион-радикалов состояния разделённых зарядов в РЦ ФС 1

Из рис. 5 видно, что основной вклад в модуляцию сигнала эха вносит частота около 3,2 МГц. На рис. 5, б показано поведение Фурье-спектров в области 3,2 МГц в увеличенном масштабе, что позволяет увидеть сдвиг ча-

стоты модуляции на ~60 кГц при повышении температуры с 150 до 280 К для образца в трегалозной матрице.

Согласно уравнению (2), на основе полученных Фурье-спектров были найдены наи-

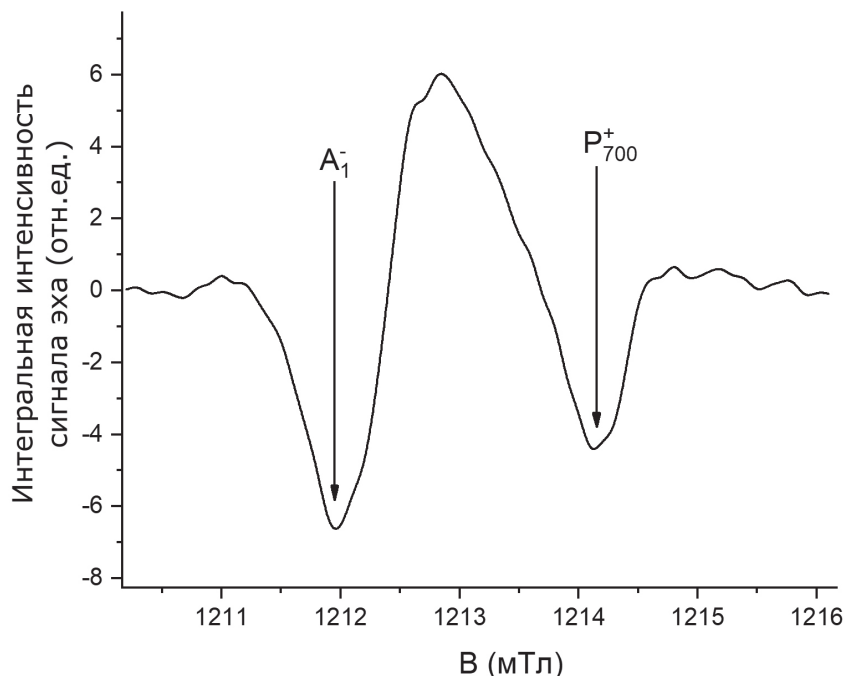


Рис. 3. Спектр ЭПР ион-радикальной пары $P_{700}^+A_1^-$ в комплексах $P_{700}-A_1$ -core ФС 1 в трегалозной матрице при 280 К. Спектр получен путём интегрирования сигнала эха для различных значений магнитного поля, интервал времени τ в двухимпульсной последовательности равен 300 нс

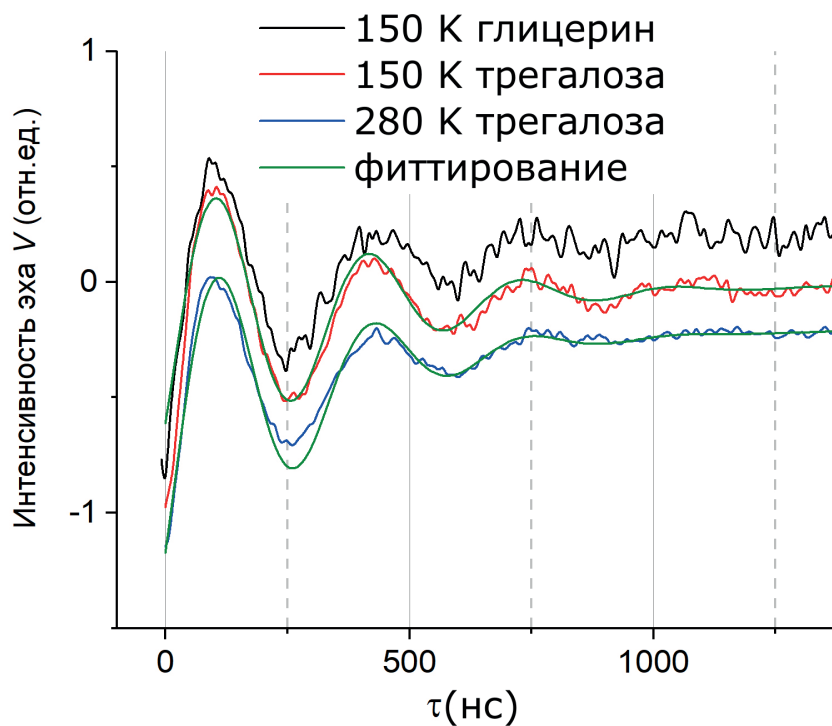


Рис. 4. ESEEM-сигналы P_{700}^+ в $P_{700}-A_1$ -core комплексе ФС 1, полученные в водно-глицериновом растворе при 150 К (чёрная кривая), в трегалозной матрице при 150 К (красная кривая) и в трегалозной матрице при 280 К (синяя кривая). Зелёными кривыми показано фиттирование экспериментальных данных согласно уравнению (3). Кривые произвольно сдвинуты по вертикали

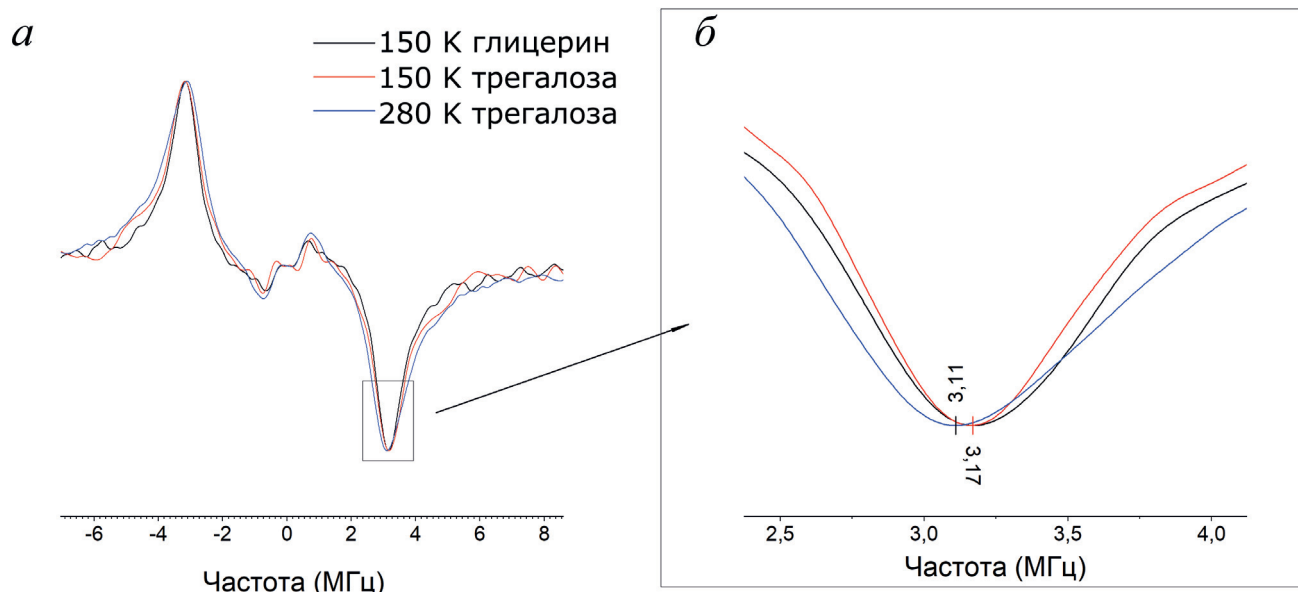


Рис. 5. Фурье-спектр ESEEM-сигналов P_{700}^+ комплекса P_{700} - A_1 -core ФС 1 (а) и его основной пик (б). Показаны спектры для комплексов в водно-глицериновом растворе при 150 К (чёрная кривая), в трегалозной матрице при 150 К (красная кривая) и в трегалозной матрице при 280 К (синяя кривая)

более вероятные значения дипольной частоты изученных систем и расстояния между электронными спинами (разделёнными зарядами). Из рис. 5 видно, что при 150 К максимумы Фурье-спектров в трегалозе и глицерине совпадают.

Для проверки полученных оценок на основе значений расстояния между спинами были рассчитаны кривые модуляции сигнала эха V согласно следующей формуле (см. [23, 31]):

$$V(\tau) = 1 - p + p \langle \cos(\omega_{d-d}\tau) \rangle, \quad (3)$$

где $\langle \cos(\omega_{d-d}\tau) \rangle = \frac{1}{2} \int \cos(\Omega(1-3 \cos^2 \vartheta)) \sin \vartheta d\vartheta$ – средняя ориентация диполь-дипольного взаимодействия, а p – вероятность переворота спинов СВЧ-импульсом в момент времени τ (см. рис. 2).

Полученные значения расстояний между катионом и анионом ион-радикальной пары $P_{700}^+A_1^-$ для разных комплексов ФС 1 и температур приведены в таблице. Там же приведены расстояния для интактной ФС 1 и комплекса P_{700} - F_X -core, лишённого терминальных 4Fe-4S кластеров F_A/F_B , взятые из наших опубликованных ранее работ [23, 24].

Из анализа приведённых в таблице данных для P_{700} - A_1 -core можно сделать два наблюдения. Во-первых, при повышении температуры на 130 К расстояние между кофакторами РЦ увеличивается только на 0,1 Å. Во-вторых, в комплексах P_{700} - A_1 -core расстояние между разделёнными зарядами P_{700}^+ и A_1^- , рассчитанное из частоты модуляции наблюдаемого ESEEM-сигнала, имеет промежуточное значение между расстояниями для пары $P_{700}^+A_{1A}^-$ и пары $P_{700}^+A_{1B}^-$ в интактной ФС 1.

Частоты модуляции наблюдаемого сигнала эха и расстояния между разделёнными зарядами P_{700}^+ и A_1^- для изученных комплексов ФС 1 в высушенной трегалозной матрице

Тип комплекса фотосистемы 1	Частота модуляции, МГц		Расстояние, Å
	из сигнала ESEEM согласно уравнению (3)	из Фурье-спектра сигнала ESEEM	
P_{700} - F_A/F_B		2,98	$26 \pm 0,1$ [23]
P_{700} - F_X -core		3,35	$25 \pm 0,1$ [24]
P_{700} - A_1 -core	150 К	3,15	$25,5 \pm 0,1$
	280 К	3,10	$25,6 \pm 0,1$

При интерпретации результатов, полученных для комплексов $P_{700}\text{-}A_1\text{-core}$, мы принимаем во внимание, что для интактной ФС 1 нами ранее было показано [23, 24], что наблюдаемая частота модуляции ESEEM-сигнала может быть меньше частоты диполь-дипольного взаимодействия, согласно формуле (1), из-за низкочастотного сдвига, вызванного спин-решёточной релаксацией спинов кофактора A_1^- . При этом существенный вклад в спин-решёточную релаксацию вносит взаимодействие с парамагнитными железо-серными комплексами. В работах Sukhanov et al. [23, 24] с учётом указанного низкочастотного сдвига частоты ESEEM были получены расстояния между разделёнными зарядами, которые оказались равными около 26 Å для $P_{700}\text{-}F_A/F_B$ и 25 Å для $P_{700}\text{-}F_X\text{-core}$. Сравнивая эти результаты с рентгенографическими данными (см. рис. 1), мы пришли к заключению, что в комплексах $P_{700}\text{-}F_A/F_B$ разделение заряда происходит преимущественно по A -ветви, а в $P_{700}\text{-}F_X\text{-core}$ разделение происходит по B -ветви реакционного центра ФС 1.

В данной работе мы исследовали комплексы $P_{700}\text{-}A_1\text{-core}$, в которых скорость спин-решёточной релаксации разделённых зарядов существенно меньше скорости спин-решёточной релаксации для $P_{700}\text{-}F_A/F_B$ комплекса ФС 1 и комплекса $P_{700}\text{-}F_X\text{-core}$. Поэтому в случае $P_{700}\text{-}A_1\text{-core}$ комплексов низкочастотный сдвиг частоты модуляции за счёт спин-решёточной релаксации пренебрежимо мал, и в этой системе частота ESEEM равна дипольной частоте (1). Наблюдаемая для $P_{700}\text{-}A_1\text{-core}$ частота модуляции сигнала эха может быть представлена как усреднённая частота модуляции сигнала в ESEEM-эксперименте для интактного $P_{700}\text{-}F_A/F_B$ и $P_{700}\text{-}F_X\text{-core}$ комплексов (здесь для интактного РЦ частота модуляции взята при $T = 150$ К, когда низкочастотный сдвиг дипольной частоты частоты модуляции пренебрежимо мал):

$$\Omega_{\text{сред}} = f \cdot (2,98 \text{ МГц}) + (1 - f) \cdot (3,35 \text{ МГц}). \quad (4)$$

Для интерпретации этого факта приходится предположить, что в разделении зарядов в комплексах $P_{700}\text{-}A_1\text{-core}$ принимают участие обе ветви кофакторов РЦ, A и B , с дипольными частотами 2,98 МГц и 3,35 МГц соответственно. Из эмпирического моделирования можно заключить, что для разделённых зарядов в РЦ ФС 1 Фурье-преобразование наблюдаемого сигнала даст одну уширенную колоколообразную кривую вместо кривой с двумя разрешёнными максимумами при выполнении двух условий. Во-первых, времена фазовой релак-

сации спинов должны быть меньше 1 мкс, и, во-вторых, расстояния между спинами в двух подансамблях пар должны отличаться не более чем на 1 Å. Оба этих условия справедливы для предполагаемых сигналов ион-радикальных пар $P_{700}^+A_{1A}^-$ и $P_{700}^+A_{1B}^-$. В этом случае можно ожидать, что наблюдаемый ESEEM-сигнал является суммой вкладов двух подансамблей РЦ с разделёнными зарядами в A - и B -ветвях (см. уравнение (3)):

$$V(\tau) = 1 - p + p \cdot (f \cos(2\pi \cdot 2,98 \text{ МГц} \cdot \tau) + (1 - f) \cos(2\pi \cdot 3,35 \text{ МГц} \cdot \tau)), \quad (5)$$

где p – вероятность переворота спинов СВЧ-импульсом в момент времени τ [мкс].

Можно указать два случая, когда изменение наблюдаемого сигнала во времени, согласно (5), приводит к появлению осцилляций с усреднённой частотой (4). Во-первых, для произвольных значений статистических весов указанных выше подансамблей (произвольного значения f в (5)) проявляется усреднённая частота (4), если электрон может достаточно быстро перескакивать между A_{1A} и A_{1B} , а именно, частота перескоков электрона должна быть равна разности частот модуляции, т.е. $3,35 - 2,98 = 0,37$ МГц. Мы считаем этот сценарий маловероятным.

Во-вторых, уравнение (5) даёт частоту модуляции (4) для равновероятного вклада ветвей A и B в разделение зарядов в РЦ, т.е. в случае $f = 1/2$ (5). В хорошем приближении частота модуляции равна усреднённой частоте (4) и тогда, когда две ветви дают сопоставимые вклады в разделение зарядов. Мы считаем, что в изученной нами системе реализуется именно такая ситуация. Для объяснения уменьшения частоты модуляции с повышением температуры (см. таблицу) приходится считать, что при нагревании должна расти доля f разделённых пар зарядов в A -ветви: $f = 0,49$ при $T = 150$ К, $f = 0,65$ при $T = 280$ К.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Найденное нами из наблюдаемой частоты ESEEM-эффекта расстояние между центрами спиновой плотности ион-радикальной пары $P_{700}^+A_1^-$ в комплексах $P_{700}\text{-}A_1\text{-core}$ ФС 1 из цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803 (25,5 Å) практически совпадает со средним между расстояниями в парах $P_{700}^+A_{1A}^-$ (~26 Å) и $P_{700}^+A_{1B}^-$ (~25 Å), что соответствует симметричному переносу электрона от димера Хл P_{700} по ветвям редокс-кофакторов A и B . Аналогичный вывод был сделан ранее на основании более косвенных

экспериментов [12, 20]. Можно отметить, что аналогичная оценка расстояния в паре $P_{700}^+A_{1A}^-$ (26 Å) была получена ранее для интактных комплексов ФС 1, а также для комплексов ФС 1, содержащих в сайте A_1 высокопотенциальные производные хинонов [16]. Схожие оценки расстояний между центрами спиновой плотности ион-радикальных пар $P_{700}^+A_1^-$ (26 и 25 Å для ветвей A и B соответственно) были также получены в работе [17] при исследовании мутантов ФС 1 с заблокированным переносом по одной из ветвей для комплексов в водно-глицериновой смеси при низкой температуре.

В работе Poluektov et al. [32] с помощью высокочастотной время-разрешённой ЭПР-спектроскопии (частота 130 ГГц) на дейтерированных комплексах ФС 1, выделенных из цианобактерии *Synechococcus leopoliensis*, были выявлены спектры ион-радикальных пар, приписанных авторами состояниям $P_{700}^+A_{1A}^-$ и $P_{700}^+A_{1B}^-$. В этой работе на интактных комплексах $P_{700}-F_A/F_B$, как и в более ранних работах на ФС 1 из цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803 [12, 16, 17, 33], при низких температурах было зарегистрировано только образование пары $P_{700}^+A_{1A}^-$. Этот результат, по мнению авторов статьи, объяснялся тем, что в условиях эксперимента перенос электронов на 4Fe-4S кластеры быстро происходил преимущественно по ветви B , не успевая рекомбинировать на P_{700}^+ за время между лазерными вспышками. В результате наблюдалась только пара $P_{700}^+A_{1A}^-$. Однако перенос электрона исключительно по ветви A наблюдался ранее в препаратах ФС 1, содержащих в сайтах связывания A_{1A} и A_{1B} высокопотенциальные производные нафтохинона [16]. Поскольку на этих препаратах ФС 1 перенос электронов на 4Fe-4S кластеры не наблюдался, то был сделан вывод о том, что преимущественный перенос электрона на A_{1A} объясняется не быстрым и практически необратимым переносом по ветви B на 4Fe-4S кластеры, а более высоким редокс-потенциалом A_{1A} по отношению к A_{1B} . В работе Poluektov et al. [32] на препаратах $P_{700}-A_1$ -core было показано, что полученный спектр ЭПР аппроксимируется суммой двух спектров, характерных для состояний $P_{700}^+A_{1B}^-$ и $P_{700}^+A_{1A}^-$ в соотношении 56 : 44.

В работе Kurashov et al. [19] на препаратах $P_{700}-A_1$ -core из *Synechocystis* sp. PCC 6803 при комнатной температуре соотношение вкладов рекомбинации пар $P_{700}^+A_{1A}^-$ и $P_{700}^+A_{1B}^-$ в растворе составляло 60 : 40 в пользу ветви A . В высушенной трегалозной матрице это соотношение инвертировалось и составляло 60 : 40 в пользу ветви B . На препаратах $P_{700}-F_X$ -core, лишённых терминальных 4Fe-4S кластеров F_A/F_B и бел-

ковой субъединицы PsaC, соотношение между ветвями A и B составляло 65 : 35 в пользу ветви A , а в трегалозной матрице — 75 : 25 в пользу ветви B . Рекомбинация зарядов с филохиноновых акцепторов A_{1A}^- и A_{1B}^- на этих препаратах наблюдалась в 40–45% РЦ за счёт того, что в этой фракции функционально активный кластер F_X присутствовал только в 55–60% РЦ [19].

В другой работе Cherepanov et al. [12] на препаратах ФС 1, выделенных из мутантного штамма *RubA*, не содержащих 4Fe-4S кластеров и функционально эквивалентных препаратам $P_{700}-A_1$ -core, была измерена температурная зависимость кинетики рекомбинации между A_1^- и P_{700}^+ . Было показано, что при комнатной температуре соотношение вкладов переноса электрона по ветвям редокс-кофакторов составляет 60 : 40 в пользу ветви A , а при понижении температуры до 150 К вклады ветвей A и B становятся равными (50 : 50). На препаратах $P_{700}-F_X$ -core соотношение обратного переноса электрона по ветвям A и B при комнатной температуре составляло 60 : 40, а при 150 К — возрастало до 77 : 23 в пользу ветви A [20].

Таким образом, полученные нами ранее результаты измерения кинетики рекомбинации зарядов в ион-радикальных парах $P_{700}^+A_{1A}^-$ и $P_{700}^+A_{1B}^-$ показали, что обратный перенос электрона на комплексах $P_{700}-A_1$ -core как при комнатной температуре, так и в водно-глицериновом растворе при температуре 150 К, а также при комнатной температуре в высушенной трегалозной матрице происходит по обеим ветвям A и B с примерно равным вкладом $50 \pm 10\%$. В то же время на препаратах $P_{700}-F_X$ -core соотношение вкладов ветвей A и B составляет $(62,5 \pm 2,5) : (37,5 \pm 2,5)$ при комнатной температуре в растворе и возрастает до 75:25 в пользу ветви A при температуре 150 К и в высушенной трегалозной матрице. Эти результаты показывают, что наличие кластера F_X способствует асимметричному переносу электрона по ветви A , причём степень асимметрии увеличивается как при понижении температуры, так и при высушивании в стекловидной трегалозной матрице, т.е. при ограничении конформационной подвижности белка.

Возникает вопрос о том, почему расстояние между центрами спиновой плотности в ион-радикальной паре $P_{700}^+A_1^-$, измеренное с помощью ESEEM, в комплексах $P_{700}-A_1$ -core соответствует примерно равному вкладу ветвей A и B , в то время как в комплексах $P_{700}-F_X$ -core это расстояние соответствует преимущественному образованию пары $P_{700}^+A_{1B}^-$? Этому экспериментальному наблюдению можно дать несколько возможных объяснений.

1) В действительности, в препаратах P_{700} - F_X -core перенос электрона идёт по ветви A , но в условиях ограниченной подвижности белка (низкая температура, высушивание в трегалозной матрице) при частоте вспышек 10 Гц происходит накопление восстановленных акцепторов F_X^- и A_{1A}^- , поскольку они не успевают рекомбинировать с P_{700}^+ . В то же время обратный перенос электрона от более низкопотенциального A_{1B}^- на P_{700}^+ происходит быстрее (характерное время 10–20 мкс), в результате чего в эксперименте ESEEM наблюдается расстояние, характерное для $P_{700}^+A_{1B}^-$.

2) На этих препаратах в трегалозной матрице происходит изменение соотношения значений редокс-потенциалов (E_m) A_{1A} и A_{1B} , в результате чего переход электрона на хинон A_{1B} становится термодинамически более предпочтительным, чем на A_{1A} .

3) При высушивании в трегалозной матрице происходит нарушение кластера молекул внутрибелковой воды вблизи сайта A_{1A} (но не вблизи сайта A_{1B}), поскольку этот кластер менее изолирован от внешней поверхности белка [19].

Возникает ещё один вопрос: почему в интактных комплексах P_{700} - F_A/F_B измеряется расстояние, соответствующее ион-радикальной паре $P_{700}^+A_{1A}^-$? Мы предполагаем, что перенос электрона в этих препаратах, так же, как и в P_{700} - F_X -core, идёт преимущественно по ветви A , но накопления восстановленного состояния A_{1A}^- в условиях эксперимента при последовательных лазерных вспышках не происходит вследствие большей ёмкости акцепторов (три 4Fe-4S кластера против одного в препаратах P_{700} - F_X -core).

Дальнейшие эксперименты с различным содержанием 4Fe-4S кластеров при встраивании в сайты A_{1A} и A_{1B} экзогенных хинонов, различающихся по структуре и редокс-потен-

циалам, могут послужить проверкой справедливости этих гипотез.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящая работа посвящена памяти выдающегося учёного в области первичных фотосинтетических реакций — Владимира Анатольевича Шувалова. В.А. Шувалов внёс неоценимый вклад в исследование механизмов первичных реакций в ФС I, включая восстановление филлохинонного акцептора A_1 . Трое из соавторов настоящей работы (М.М., Г.М. и А.С.) были соавторами многих работ В.А. Шувалова в течение последних 15 лет и с благодарностью вспоминают период совместной работы с В.А. Шуваловым как исключительно интересный и продуктивный.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке РНФ и Кабинета Министров Республики Татарстан в рамках научного проекта № 22-23-20165 (URL: <https://rscf.ru/project/22-23-20165/>).

Вклад авторов. М.Д. Мамедов, Г.Е. Милановский — получение комплексов ФС I; А.А. Суханов, К.М. Салихов — получение спектров ЭПР; А.Ю. Семенов — концепция и руководство работой, написание текста статьи; М.Д. Мамедов, Г.Е. Милановский, А.А. Суханов, К.М. Салихов, А.Ю. Семенов — обсуждение результатов исследования и редактирование текста статьи.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Jordan, P., Fromme, P., Witt, H. T., Klukas, O., Saenger, W., and Krauß, N. (2001) Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution, *Nature*, **411**, 909–917, doi: 10.1038/35082000.
- Brettel, K., and Leibl, W. (2001) Electron transfer in photosystem I, *Biochim. Biophys. Acta*, **1507**, 100–114, doi: 10.1016/S0005-2728(01)00202-X.
- Srinivasan, N., and Golbeck, J. H. (2009) Protein-cofactor interactions in bioenergetic complexes: the role of the A_{1A} and A_{1B} phyloquinones in Photosystem I, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1787**, 1057–1088, doi: 10.1016/j.bbabi.2009.04.010.
- Parrett, K. G., Mehari, T., Warren, P. G., and Golbeck, J. H. (1989) Purification and properties of the intact P-700 and F_X -containing Photosystem I core protein, *Biochim. Biophys. Acta*, **973**, 324–332, doi: 10.1016/S0005-2728(89)80439-6.
- Brettel, K., and Golbeck, J. H. (1995) Spectral and kinetic characterization of electron acceptor A_1 in a Photosystem I core devoid of iron-sulfur centers F_X , F_B and F_A , *Photosynth. Res.*, **45**, 183–193, doi: 10.1007/BF00015559.
- Makita, H., and Hastings, G. (2015) Directionality of electron transfer in cyanobacterial photosystem I

- at 298 and 77 K, *FEBS Lett.*, **589**, 1412-1417, doi: 10.1016/j.febslet.2015.04.048.
7. Joliot, P., and Joliot, A. (1999) *In vivo* analysis of the electron transfer within photosystem I: Are the two phylloquinones involved? *Biochemistry*, **38**, 11130-11136, doi: 10.1021/bi990857c.
 8. Schlodder, E., Falkenberg, K., Gergeleit, M., and Brettel, K. (1998) Temperature dependence of forward and reverse electron transfer from A_1^- , the reduced secondary electron acceptor in photosystem I, *Biochemistry*, **37**, 9466-9476, doi: 10.1021/bi973182r.
 9. 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, doi: 10.1073/pnas.081078898.
 10. Ptushenko, V. V., Cherepanov, D. A., Krishtalik, L. I., and Semenov, A. Y. (2008) Semi-continuum electrostatic calculations of redox potentials in photosystem I, *Photosynth. Res.*, **97**, 55-74, doi: 10.1007/s11120-008-9309-y.
 11. Ishikita, H., and Knapp, E.-W. (2003) Redox potential of quinones in both electron transfer branches of photosystem I, *J. Biol. Chem.*, **278**, 52002-52011, doi: 10.1074/jbc.M306434200.
 12. Cherepanov, D. A., Milanovsky, G. E., Gupta, O. A., Balasubramanian, R., Bryant, D. A., et al. (2018) Electron-phonon coupling in cyanobacterial photosystem I, *J. Phys. Chem. B*, **122**, 7943-7955, doi: 10.1021/acs.jpcc.8b03906.
 13. Ishikita, H., Stehlik, D., Golbeck, J. H., and Knapp, E.-W. (2006) Electrostatic influence of PsaC protein binding to the PsaA/PsaB heterodimer in photosystem I, *Biophys. J.*, **90**, 1081-1089, doi: 10.1529/biophysj.105.069781.
 14. Plato, M., Krauß, N., Fromme, P., and Lubitz, W. (2003) Molecular orbital study of the primary electron donor P_{700} of photosystem I based on a recent X-ray single crystal structure analysis, *Chem. Phys.*, **294**, 483-499, doi: 10.1016/S0301-0104(03)00378-1.
 15. Lubitz, W. (2006) EPR studies of the primary electron donor P_{700} in photosystem, in *Photosystem I*, Dordrecht, Springer Netherlands, pp. 245-269, doi: 10.1007/978-1-4020-4256-0_17.
 16. Mula, S., Savitsky, A., Möbius, K., Lubitz, W., Golbeck, J. H., et al. (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, doi: 10.1039/c2pp05340c.
 17. Savitsky, A., Gupta, O., Mamedov, M., Golbeck, J. H., Tikhonov, A., et al. (2010) Alteration of the axial met ligand to electron acceptor A_0 in Photosystem I: effect on the generation of $P_{700}^+ A_1^-$ radical pairs as studied by W-band transient EPR, *Appl. Magnetic Resonance*, **37**, 85-102, doi: 10.1007/s00723-009-0052-0.
 18. Sun, J., Hao, S., Radle, M., Xu, W., Shelaev, I., Nadochenko, V., et al. (2014) Evidence that histidine forms a coordination bond to the A_{0A} and A_{0B} chlorophylls and a second H-bond to the A_{1A} and A_{1B} phylloquinones in M688H_{PsaA} and M668H_{PsaB} variants of *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1837**, 1362-1375, doi: 10.1016/j.bbabi.2014.04.004.
 19. Kurashov, V., Gorka, M., Milanovsky, G. E., Johnson, T. W., Cherepanov, D. A., et al. (2018) Critical evaluation of electron transfer kinetics in P_{700} -F_A/F_B, P_{700} -F_X, and P_{700} -A₁ Photosystem I core complexes in liquid and in trehalose glass, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1859**, 1288-1301, doi: 10.1016/j.bbabi.2018.09.367.
 20. Milanovsky, G., Gupta, O., Petrova, A., Mamedov, M., Gorka, M., et al. (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, doi: 10.1016/j.bbabi.2019.06.008.
 21. Malferrari, M., Savitsky, A., Mamedov, M. D., Milanovsky, G. E., Lubitz, W., et al. (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, doi: 10.1016/j.bbabi.2016.05.001.
 22. Shelaev, I., Gorka, M., Savitsky, A., Kurashov, V., Mamedov, M., et al. (2017) Effect of dehydrated trehalose matrix on the kinetics of forward electron transfer reactions in photosystem I, *Zeitschr. Physikal. Chemie*, **231**, 325-345, doi: 10.1515/zpch-2016-0860.
 23. Sukhanov, A. A., Mamedov, M. D., Möbius, K., Semenov, A. Y., and Salikhov, K. M. (2018) The decrease of the ESEEM frequency of $P_{700}^+ A_1^-$ ion-radical pair in Photosystem I Embedded in trehalose glassy matrix at room temperature can be explained by acceleration of spin-lattice relaxation, *Appl. Magnetic Resonance*, **49**, 1011-1025, doi: 10.1007/s00723-018-1017-y.
 24. Sukhanov, A. A., Mamedov, M. D., Möbius, K., Semenov, A. Y., and Salikhov, K. M. (2020) Impact of iron-sulfur clusters on the spin-lattice relaxation rate and ESEEM frequency of the oxidized primary donor P_{700}^+ and reduced phylloquinone acceptor A_1^- in radical pairs in Photosystem I embedded in trehalose glassy matrix, *Appl. Magnetic Resonance*, **51**, 909-924, doi: 10.1007/s00723-020-01210-4.
 25. Savitsky, A., Malferrari, M., Francia, F., Venturoli, G., and Möbius, K. (2010) Bacterial photosynthetic reaction centers in trehalose glasses: coupling between protein conformational dynamics and electron-transfer kinetics as studied by laser-flash and high-field EPR spectroscopies, *J. Phys. Chem. B*, **114**, 12729-12743, doi: 10.1021/jp105801q.

26. Möbius, K., Savitsky, A., Malferrari, M., Francia, F., Mamedov, M. D., et al. (2020) Soft dynamic confinement of membrane proteins by dehydrated trehalose matrices: high-field EPR and fast-laser studies, *Appl. Magnetic Resonance*, **51**, 773-850, doi: 10.1007/s00723-020-01240-y.
27. Shen, G., Zhao, J., Reimer, S. K., Antonkine, M. L., Cai, Q., et al. (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, doi: 10.1074/jbc.M201103200.
28. 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, doi: 10.1016/S0006-3495(97)78669-7.
29. Salikhov, K. M. (1976) *Electron Spin Echo and Its Applications* [in Russian] (Semenov, A. G., and Tsvetkov, Y. D., eds) Nauka, Novosibirsk, Siberian branch.
30. 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. Magnetic Resonance*, **3**, 199-216, doi: 10.1007/BF03166790.
31. Salikhov, K. M., Khairuzhdinov, I. T., and Zaripov, R. B. (2014) Three-pulse ELDOR theory revisited, *Appl. Magnetic Resonance*, **45**, 573-619, doi: 10.1007/s00723-014-0541-7.
32. Poluektov, O. G., Niklas, J., and Utschig, L. M. (2019) Spin-correlated radical pairs as quantum sensors of bidirectional ET mechanisms in Photosystem I, *J. Phys. Chem. B*, **123**, 7536-7544, doi: 10.1021/acs.jpcc.9b06636.
33. Dashdorj, N., Xu, W., Cohen, R. O., Golbeck, J. H., and Savikhin, S. (2005) Asymmetric electron transfer in cyanobacterial Photosystem I: charge separation and secondary electron transfer dynamics of mutations near the primary electron acceptor A₀, *Biophys. J.*, **88**, 1238-1249, doi: 10.1529/BIOPHYSJ.104.050963.

CHANGE IN ELECTRON TRANSFER SYMMETRY IN THE REACTION CENTERS OF PHOTOSYSTEM I UPON REMOVAL OF IRON-SULFUR CLUSTERS

A. A. Sukhanov¹, M. D. Mamedov², G. E. Milanovsky²,
K. M. Salikhov¹, and A. Yu. Semenov^{2*}

¹ *Zavoisky Physical-Technical Institute, FRC Kazan Scientific Center, Russian Academy of Sciences, 420029 Kazan, Russia*

² *Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia; e-mail: semenov@belozersky.msu.ru*

In photosynthetic reaction centers of intact complexes of photosystem I (PSI) from cyanobacteria, electron transfer at room temperature occurs along two symmetrical branches of redox cofactors A and B at a ratio of ~3:1 in favor of branch A. Previously, this was indirectly demonstrated using pulsed absorption spectroscopy and more directly by measuring the decay modulation frequencies of electron spin echo signals (Electron Spin Echo Envelope Modulation, ESEEM), which allows to determine the distance between the separated charges of the primary electron donor P₇₀₀⁺ and phyloquinone acceptors A_{1A}⁻ and A_{1B}⁻ in the branches of cofactors A and B. In the present work, these distances were determined using ESEEM on PSI complexes lacking three 4Fe-4S clusters, F_X, F_A, and F_B, as well as the PsaC protein subunit (the so-called P₇₀₀-A₁-core), in which phyloquinone molecules A_{1A} and A_{1B} serve as the terminal electron acceptors. It was shown that on P₇₀₀-A₁-core preparations, the average distance between the centers of the P₇₀₀⁺A₁⁻ radical ion pair at a temperature of 150 K in an aqueous glycerol solution and in a dried trehalose matrix, as well as in a trehalose matrix at a temperature of 280 K, is ~25.5 Å, which corresponds to the symmetrical electron transfer along the branches of redox cofactors A and B at a ratio of 1:1. Possible reasons for the change in the electron transfer symmetry in PSI upon removal of the PsaC subunit and 4Fe-4S clusters F_X, F_A, and F_B are discussed.

Keywords: photosystem I, electron transfer, Electron Spin Echo Envelope Modulation (ESEEM), trehalose matrix, iron-sulfur clusters