

УДК 577.355.3

ПЕРЕНОС ЭЛЕКТРОНА В ФОТОСИСТЕМЕ I, СОДЕРЖАЩЕЙ НАТИВНЫЕ И МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ХИНОННЫЕ АКЦЕПТОРЫ

Обзор

© 2015 А.Ю. Семенов^{1,2*}, А.А. Петрова¹,
М.Д. Мамедов¹, В.А. Надточенко²

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

² Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН,
119991 Москва; факс: +7(499)137-8357

Поступила в редакцию 27.01.15
После доработки 08.03.15

Пигмент-белковый комплекс фотосистемы I (ФС I) катализирует светозависимое окисление пластоцианина или цитохрома c_6 и восстановление ферредоксина или флаводоксина у окисленных фотосинтезирующих организмов. В обзоре дано современное представление о процессах переноса энергии возбуждения и формирования первичной и вторичной ион-радикальных пар в комплексах ФС I. Обсуждаются реакции переноса электронов с участием хинонного акцептора в сайте A_1 и его роль в обеспечении асимметрии электронного транспорта и взаимодействия с кислородом и аскорбатом в ФС I.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: фотосистема I, реакционный центр, перенос электрона, асимметрия, первичные реакции, хинонные акцепторы, взаимодействие с кислородом и аскорбатом.

СТРУКТУРА КОМПЛЕКСОВ ФОТОСИСТЕМЫ I

Пигмент-белковый комплекс фотосистемы I (ФС I) является одним из ключевых ферментов фотосинтетической электрон-транспортной цепи в тилакоидных мембранах окисленных организмов [1]. Комплекс ФС I катализирует светозависимую реакцию переноса электронов от периферических белков-доноров, пластоцианина или цитохрома c_6 , к ферредоксину или флаводоксину.

Принятые сокращения: ФС I – фотосистема I; PC – реакционный центр; Chl – хлорофилл; Chl1A/Chl1B, Chl2A/Chl2B, Chl3A/Chl3B – первые, вторые и третьи молекулы хлорофилла в симметричных ветвях редокс-кофакторов **A** и **B** ФС I; P700 – специальная пара молекул хлорофилла – первичный донор электрона; A_{0A} , A_{0B} – хлорофильные первичные акцепторы электрона в ветвях **A** и **B**; A_{1A} , A_{1B} – молекулы филлохинонов – вторичные акцепторы электрона в ветвях **A** и **B**; PhQ – филлохинон; PQ – пластохинон, Cl_2NQ – 2,3-дихлор-1,4-нафтохинон.

* Адресат для корреспонденции.

Структура тримерной формы комплексов ФС I из термофильных цианобактерий *Synechococcus elongatus* была определена с помощью рентгеноструктурного анализа с атомным разрешением 2,5 Å [2]. Каждый мономер фермента с мол. массой ~330 кДа содержит по одной копии 12 белковых субъединиц (девяти трансмембранных и трех периферических) и является местом локализации ~130 небелковых кофакторов, включая 96 молекул хлорофилла *a* (Chl), 22 молекулы β -каротина, три [4Fe-4S] кластера, две молекулы филлохинона и четыре молекулы липида. Отметим, что в состав ФС I также входят 201 молекула воды и ион кальция. Две трансмембранные субъединицы PsaA и PsaB формируют C_2 -симметричное гетеродимерное ядро комплекса, содержащее большинство кофакторов переноса электрона.

Цепь переноса электрона в ФС I состоит из специальной пары молекул хлорофилла – первичного донора электрона P700, (Chl1A/Chl1B), A_0 (пар молекул Chl, обозначенных как Chl2A/Chl3A и Chl2B/Chl3B), A_1 (молекул филлохинонов, обозначаемых, как A_{1A}/A_{1B}) и железо-серных кластеров F_X , F_A и F_B (рис. 1).

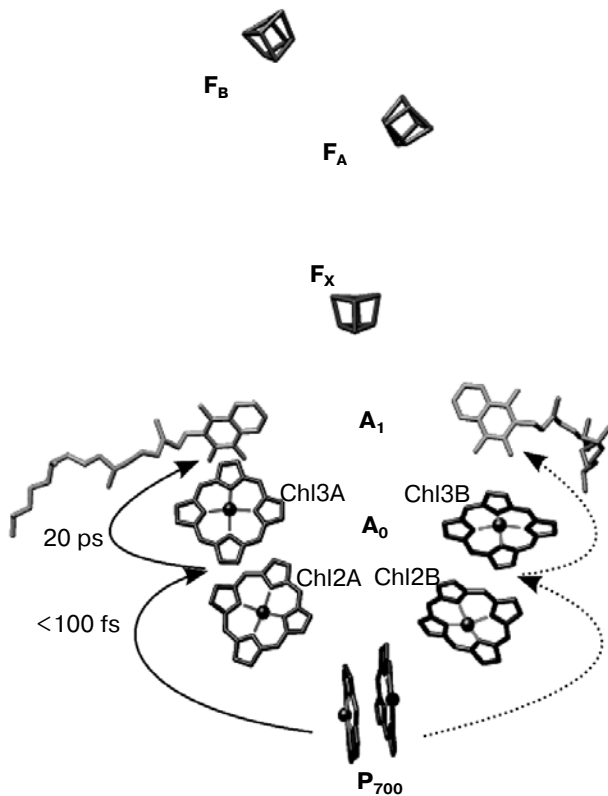


Рис. 1. Схема расположения редокс-кофакторов и переноса электрона в ФС I

В настоящее время известно, что перенос электронов в ФС I происходит по обеим ветвям редокс-кофакторов от P700 на F_X , но вопросы о степени асимметрии этого переноса и факторах, которые ее определяют, до сих пор остаются открытыми [3, 4]. Кроме того, на сегодняшний день кинетика первичного разделения зарядов и природа первичного донора и акцептора электронов в ФС I по-прежнему являются предметом дискуссий [4, 5].

Как упоминалось выше, из 96-ти молекул Chl шесть являются кофакторами переноса электронов и локализованы вблизи поверхностей контакта PsaA и PsaB субъединиц. P700 состоит из двух молекул Chl *a* (Chl1A/Chl1B), плоскости порфиринов которых параллельны друг другу (расстояние 3,6 Å) и перпендикулярны плоскости мембраны. Пространственная локализация двух других молекул Chl (Chl2A/Chl2B) примерно соответствует расположению двух молекул мономерного бактериохлорофилла в РЦ пурпурных бактерий, а две оставшиеся молекулы Chl (Chl3A и Chl3B) расположены аналогично двум молекулам бактериофеофитина в РЦ пурпурных бактерий [6, 7]. Плоскости порфи-

риновых колец молекул Chl2A (Chl2B) и Chl3A (Chl3B) параллельны (расстояния 3,9 Å), но по сравнению с Chl1A и Chl1B, они в большей степени сдвинуты друг относительно друга. Взаимное расположение и относительно близкое расстояние между центральными атомами Mg^{2+} в молекулах Chl2A и Chl3A и Chl2B и Chl3B (8,7 и 8,2 Å соответственно) указывают на наличие значительного взаимодействия между этими парами молекул Chl. Это обстоятельство позволяет рассматривать первичные акцепторы в ветвях редокс-кофакторов А и В — A_{0A} и A_{0B} , как димеры молекул хлорофилла Chl2A/Chl3A и Chl2B/Chl3B соответственно.

Как указано выше, ФС I также содержит две молекулы филохинона (A_{1A} и A_{1B}). Ветвь А включает в себя молекулы хлорофилла, обозначенные Chl1A, Chl2A, Chl3A, и филохинона A_{1A} , в то время как ветвь В включает Chl1B, Chl2B, Chl3B и филохинон A_{1B} . Две ветви кофакторов цепи переноса электронов соединяются на железо-серном кластере F_X . Терминальные акцепторы электронов — [4Fe-4S] кластеры F_A и F_B — расположены на стромальной субъединице PsaC.

ПЕРЕНОС ЭНЕРГИИ ВОЗБУЖДЕНИЯ И ПЕРЕНОС ЭЛЕКТРОНА В РЦ ФС I

В большинстве ранних исследований предполагалось, что в комплексах ФС I из цианобактерий первичное разделение зарядов происходит между возбужденной формой первичного донора (P700*) и первичного акцептора A_0 в диапазоне времени 0,8–4 пс, в то время как перенос электрона от A_0 к вторичному акцептору A_1 происходит за 10–50 пс [8–10]. Недавно на комплексах ФС I из *Synechocystis* sp. PCC 6803 нами было показано, что при преимущественном возбуждении P700 и A_0 образование первичной радикальной пары $P700^+A_0^-$ происходит за время короче 100 фс, а дальнейший перенос электрона с образованием $P700^+A_1^-$ имеет характерное время ~25 пс [5]. Последующие реакции переноса электрона от A_{1A} и A_{1B} к F_X происходят с характерными временами ~200 и ~20 нс соответственно [1, 3, 11, 12]. Далее происходит перенос электрона от F_X на терминальные железо-серные кластеры F_A и F_B и затем к ферредоксину или флаводоксину. Фотоокисленный P700 восстанавливается от пластоцианина или цитохрома c_6 , в результате чего все кофакторы переноса электрона возвращаются в исходное состояние [1].

Основное различие между ФС I и бактериальным РЦ заключается в невозможности preparативного отделения молекул Chl светособирающей антенны от молекул Chl РЦ без влия-

ния на структурно-функциональную целостность ферментного комплекса. Трудность заключается в том, что 79 молекул Chl локализуется в белковых субъединицах PsaA/PsaB, которые также связывают шесть молекул Chl, участвующих в первичных процессах переноса электрона в РЦ. В целом 96 молекул Chl не могут быть четко разделены по их спектральным характеристикам. Согласно работе [13], большая часть Chl антенны имеет максимум поглощения в спектральном диапазоне 670–680 нм, в то время как некоторые молекулы хлорофилла (возможно, димеры или тримеры) характеризуются полосами поглощения в диапазоне 690–710 нм. Общеизвестно, что специальная пара молекул Chl (P700) имеет максимум поглощения при 700–705 нм, а максимальное поглощение акцептора A_0 наблюдается в полосе 685–690 нм [14–16], однако их спектры частично перекрываются со спектрами нескольких молекул хлорофилла антенны в той же области спектра.

Перенос энергии возбуждения в антенне и перенос электрона в РЦ ФС I были исследованы различными методами, в частности, с помощью субпикосекундной лазерной спектроскопии [5, 8–10]. Однако первичные реакции переноса электрона не могут быть четко отделены от переноса энергии возбуждения в антенне, так как эти реакции происходят в одном и том же диапазоне времени. Чтобы отделить перенос электрона от переноса энергии возбуждения и более четко выявить кинетику первичных стадий разделения зарядов и спектры соответствующих интермедиатов были использованы различные подходы. В частности, Кумазаки с соавт. [17] экстрагировали большую часть Chl антенны из комплекса ФС I, в результате чего были выявлены две кинетические компоненты с характерными временами ~0,8 и ~9 пс. Эти фазы были приписаны первичному разделению зарядов. Отметим, что снижение общего содержания хлорофилла до 12–14 молекул, скорее всего, значительно изменяет структуру и функцию комплекса ФС I.

Есть две основные модели, описывающие разделение зарядов в ФС I. Согласно первой модели, при поглощении света первичный донор электрона P700 переходит в возбужденное состояние P700*, за которым следует разделение зарядов между P700* и первичным акцептором электрона A_0 с образованием ион-радикальной пары P700⁺A₀⁻. Данные, полученные с помощью пикосекундной абсорбционной спектроскопии на частицах ФС I из шпината, позволили предположить, что непосредственное (<1,5 пс) выцветание P700 и формирование полосы при 810 нм обусловлены возбуждением P700 и образова-

нием состояния P700* [18]. В ближней инфракрасной области спектра в результате возбуждения образцов полоса при 810 нм выцветала до ~60% от ее первоначальной интенсивности с тем же характерным временем ~14 пс, что и формирование полосы при 690 нм. Эти спектральные изменения были интерпретированы как процесс образования первичной ион-радикальной пары P700⁺A₀⁻.

В одной из ранних работ было показано, что селективное возбуждение ФС I пикосекундными лазерными импульсами при 710 нм приводит к формированию состояния P⁺A₀⁻, которое характеризуется двумя полосами выцветания: при 700 нм, соответствующей образованию P700⁺ и при 689 нм – вследствие восстановления первичного акцептора A_0 [14].

Другой подход для выявления природы первичных реакций в комплексах ФС I основан на вычитании времязрешенных спектров химически окисленного (закрытого) РЦ из спектров восстановленного (открытого) РЦ [19]. Такой подход позволил авторам исключить спектральные изменения, вызванные переносом энергии возбуждения в антенне и выявить спектральные особенности, отражающие перенос электрона в РЦ. Гастингс с соавт. [15] использовали этот подход для частиц ФС I из цианобактерий и обнаружили две кинетические фазы со временами жизни ~4 и ~21 пс. Эти компоненты были отнесены к образованию и исчезновению ион-радикальной пары P700⁺A₀⁻. В этой работе было применено неселективное возбуждение при 590 нм, и, следовательно, наблюдаемая фаза со временем жизни 4 пс отражала не только реакцию окисления P700, но также и перенос энергии в антенне. Таким образом, время жизни ~4 пс может представлять собой верхний предел константы скорости для кинетики образования первичной ион-радикальной пары. Кроме того, чтобы получить хорошее соотношение сигнал/шум, Гастингс с соавт. [15] использовали лазерные вспышки достаточно высокой энергии, которые индуцировали аннигиляцию возбуждения и укорачивали общее время достижения состояния одноэкситонного возбуждения в антенне.

Савихин с соавт. [16] применили аналогичный подход и выявили 10-пс кинетическую компоненту, приписанную формированию состояния P700⁺A₀⁻. Они возбуждали ФС I лазерными вспышками длительностью 100 фс с максимумом при 660 нм. При использовании простой модели переноса электрона и аппроксимации кинетики спектральных изменений с помощью двух свободных параметров этими же авторами были получены характерные времена ~1,3 пс для формирования P700⁺A₀⁻ и ~13 пс для после-

дующей реакции $A_0 \rightarrow A_1$ [20]. Аналогичные результаты для комплексов ФС I из шпината были получены ранее Уайтом с соавт. [21].

Мелкозернов и соавт. [22] исследовали быстрые спектральные изменения в ФС I из цианобактерии *Synechocystis* sp. PCC 6803 путем возбуждения образцов 150-фс лазерными вспышками с максимумами при 660, 693 и 710 нм. Они предположили, что изменение поглощения при 700 нм вызвано первичным разделением зарядов и происходит примерно за 20 пс, причем реакция переноса электрона $P700^*A_0 \rightarrow P700^+A_0^-$ является скоростью лимитирующей, в то время как квазиравновесие в антенне устанавливается за ~3 пс. Другие авторы предполагали, что перенос энергии возбуждения в антенне происходит медленнее — с характерными временами 20–25 пс [20, 23].

Мюллер с соавт. [24] предложили альтернативную модель первичного разделения зарядов. Они исследовали комплекс ФС I из *Chlamydomonas reinhardtii* и, основываясь на моделировании кинетики и анализе спектров дифференциального поглощения, предположили, что первичное разделение зарядов должно происходить за 6–9 пс. Они также посчитали, что первичной радикальной парой является не $P700^+A_0^-$, а $P700^+Chl2^-$ или $Chl2^+Chl3^-$, где Chl2 и Chl3 — соответственно, дистальная и проксимальная по отношению к P700 молекулы мономера Chl в РЦ. В работах Мюллера с соавт. [24] и Хольцварта с соавт. [25, 26] были выявлены кинетические компоненты с характерными временами ~6, ~20 и ~40 пс. Хольцварт с соавт. [25, 26] предложили схему первичного разделения зарядов в ФС I, в соответствии с которой быстрая компонента соответствует формированию первичной радикальной пары $Chl2^+Chl3^-$, а две медленные компоненты соответствуют радикальным парам $P700^+Chl3^-$ и $P700^+A_0^-$. Однако, согласно электростатическим расчетам, функционирование мономерных хлорофиллов Chl2A/2B в качестве первичных доноров, а мономерных хлорофиллов Chl3A/3B, как первичных акцепторов, является маловероятным, так как в этом случае перенос электронов будет термодинамически невыгоден [27].

ПЕРВИЧНЫЕ СТАДИИ РАЗДЕЛЕНИЯ ЗАРЯДОВ ПРИ ПРЕИМУЩЕСТВЕННОМ ВОЗБУЖДЕНИИ ХЛОРОФИЛЛОВ РЕАКЦИОННОГО ЦЕНТРА 20-ФЕМТОСЕКУНДНЫМИ ИМПУЛЬСАМИ

В большинстве исследований, посвященных изучению быстрой кинетики спектральных изменений в ФС I, были использованы вспышки

длительностью >100 фс; кроме того, в некоторых работах применялись вспышки довольно высокой интенсивности. При этом с большой вероятностью один и тот же комплекс ФС I возбуждался двумя квантами, в результате чего происходила экситон-экситонная аннигиляция и искажение кинетики спектральных изменений.

В работах нашей лаборатории [5, 28, 29] был использован комплексный подход, включающий короткие (~20 фс) лазерные вспышки относительно малой мощности (20 нДж) с максимумом при 720 нм. В таких условиях были измерены временные изменения дифференциальных спектров ФС I из *Synechocystis* sp. PCC 6803. Поскольку фемтосекундный импульс длительностью 20 фс имеет спектральную ширину ~40 нм, то при спектральном максимуме импульса 720 нм пигменты антенны (хлорофиллы и каротиноиды), поглощающие в коротковолновой области Q_y -полосы, практически не возбуждаются. Показано, что в этих условиях с вероятностью ~50% квант импульса возбуждения поглощается пигментами РЦ, а именно, димером хлорофилла — первичным донором электрона P700 и димером хлорофилла — первичным акцептором электрона A_0 . С оставшейся ~50% долей вероятности энергия кванта поглощается молекулами хлорофилла антенны. При энергии импульса накачки менее 20 нДж среднее число поглощенных квантов на одну ФС I обеспечивается на уровне 0,10–0,15. При таком возбуждении вкладом в измеряемые спектрально-кинетиические зависимости от би- или мульти-экситонных возбуждений ФС I можно пренебречь.

Эти условия были выбраны, чтобы максимально увеличить относительный вклад прямого возбуждения РЦ и отделить кинетику первичных стадий разделения зарядов в РЦ от кинетики переноса энергии возбуждения в антенне. Возбуждение в антенне переносится на P700 безызлучательно; это наблюдается в виде отдельной кинетической компоненты и отличается от реакции переноса заряда в РЦ по спектрально-кинетиическим измерениям. Благодаря этому оказалось возможным выявить дифференциальные спектры состояний ($P700A_0$)*, $P700^+A_0^-$ и $P700^+A_0^-$ и описать кинетику переходов между этими интермедиатами.

На рис. 2, а показаны разностные спектры ФС I, полученные при возбуждении образцов (720 нм) 20 фс лазерными импульсами на различных временных задержках. Видно, что при задержках до 100 фс в спектрах происходят существенные изменения: начальный пик выцветания 690 нм при временной задержке $t = 0$ трансформируется в полосу выцветания из двух пиков при 690 и 705 нм к моменту $t = 100$ фс.

Пики выцветания при 690 и 705 нм можно отнести к выцветанию полос поглощения A_0 (690 нм) и $P700$ (705 нм), что предполагает образование первичной ион-радикальной пары $P700^+A_0^-A_1$ с характерным временем менее 100 фс.

При нулевой задержке времени выцветания находится на 690 нм, это соответствует максимуму перекрытия поглощения молекул Chl в Q_y -полосе и спектра возбуждающего им-

пульса (рис. 2, а). При задержке более 10 фс происходит спад выцветания при 690 нм и появление дополнительной полосы выцветания при 705 нм. Этот процесс начинается с первых 10 фс и развивается до 60 фс (рис. 2, б) и, вероятно, относится к процессу переноса энергии. Кинетическую кривую отношения пиков выцветания $\Delta A_{705}/\Delta A_{690}$ можно смоделировать в рамках формализма квантовых биений [30, 31]. Теория квантовых биений для двух взаимодействующих состояний A_0^* и $P700^*$ рассмотрена подробно в работе [5]. Согласно данной модели, возбуждение осциллирует между хромофорами A_0 и $P700$ (рис. 2, б). Эти осцилляции будут затухать, если дополнительный процесс не приведет к релаксации когерентности. В РЦ ФС I таким процессом потери когерентности, очевидно, будет перенос электрона от $P700$ к A_0 (рис. 2, б). Формирование первичной ион-радикальной пары $P700^+A_0^-$ объясняет отклонение от теоретической кривой модели квантовых биений для задержек более 80 фс и практически постоянное наблюдаемое отношение $\Delta A_{705}/\Delta A_{690}$ во временном диапазоне от 80 фс до ~10 пс.

Существенные изменения в дифференциальных спектрах проявляются в шкале времени от нескольких пикосекунд до сотен пикосекунд (рис. 3). Изменения в пикосекундной шкале обусловлены двумя процессами – переносом энергии на первичный донор электрона $P700$ с последующим быстрым разделением заряда с образованием $P700^+A_0^-A_1$ и процессом образования вторичной ион-радикальной пары $P700^+A_0^-A_1^-$. Характерные спектральные признаки дифференциального спектра $P700^+A_0^-A_1^-$ показаны на рис. 3. В спектрах выявляются следующие характерные признаки: полоса выцветания при 705 нм, связанная с образованием $P700^+$; полоса выцветания около 685 нм и характерный пик при 692 нм, обусловленные керровским сдвигом полосы поглощения A_0 ; полоса выцветания между 658 и 578 нм, вероятно, связанная с керровским сдвигом полосы поглощения молекулы каротиноида антенны ФС I; и, наконец, спектральная особенность в виде провала в полосе поглощения на длине волны 458 нм. Кроме того, в спектрах проявляется выцветание в области полосы Core около 440 нм и широкая полоса поглощения между 449 и 578 нм, которую, вероятно, следует отнести к поглощению $P700^+$. В коротковолновой области спектра (<413 нм) проявляется край полосы поглощения филлохинона – вторичного акцептора A_1 .

Полученные результаты могут быть обобщены следующей схемой:

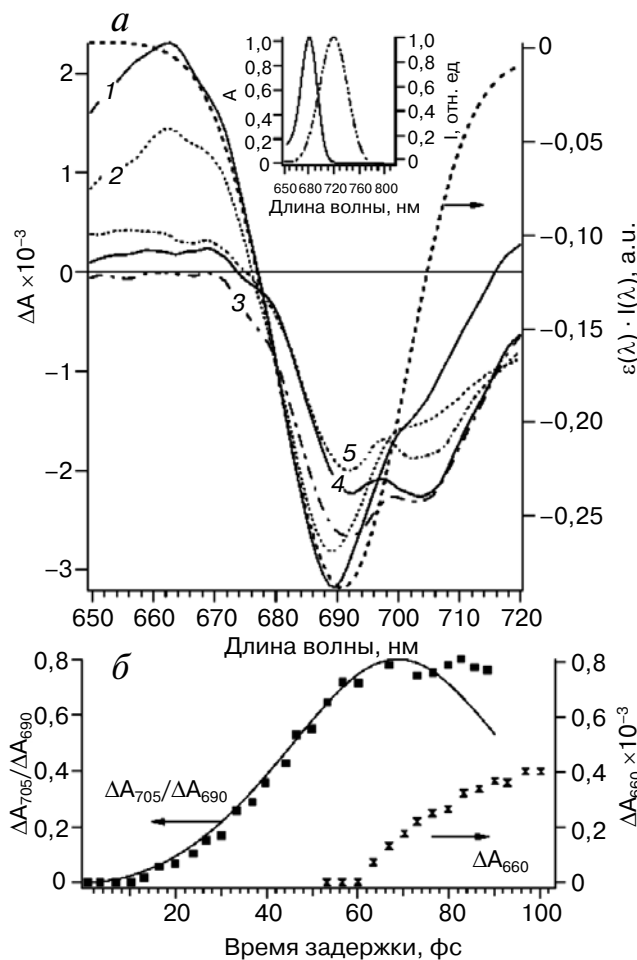
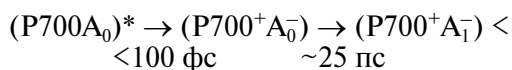


Рис. 2. а – Эволюция дифференциальных спектров поглощения во временном диапазоне от 0 до 100 фс. Время задержки: 1 – 0 фс; 2 – 20 фс; 3 – 50 фс; 4 – 60 фс; 5 – 100 фс. Энергия возбуждения 20 нДж, длина волны 720 нм, длительность 22 фс. Пунктирная линия – отрицательное значение интеграла перекрытия спектра лазерного импульса $I(\lambda)$ и полосы поглощения $Q_y \varepsilon(\lambda)$. Интеграл $\int \varepsilon(\lambda) I(\lambda) d\lambda$ относится к правой оси. На вставке показаны спектры лазерного импульса $I(\lambda)$ и полосы поглощения $Q_y \varepsilon(\lambda)$; б – левая ось – временная зависимость отношения дифференциального поглощения $\Delta A_{705}/\Delta A_{690}$. Экспериментальные точки обозначены квадратами, сплошная линия – теоретическая кривая, моделирующая квантовое смешение двух возбужденных уровней энергии A_0^* и $P700^*$. Правая ось – кинетика дифференциального поглощения ΔA_{660} при задержках от 60 фс (песочные часы)

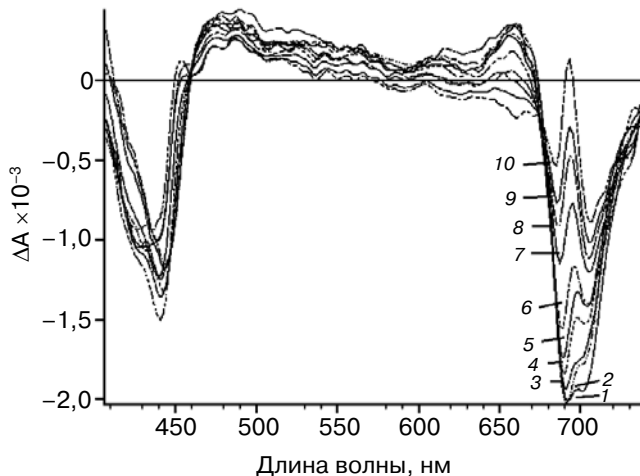


Рис. 3. Дифференциальные спектры поглощения ФС I после возбуждения импульсом длительностью 22 фс с максимумом при 720 нм. Время задержки: 1 – 85 фс; 2 – 150 фс; 3 – 500 фс; 4 – 2 пс; 5 – 4 пс; 6 – 8 пс; 7 – 20 пс; 8 – 30 пс; 9 – 50 пс; 10 – 90 пс

В нашей недавней работе на комплексах ФС I из цианобактерий были исследованы разрешенные во времени дифференциальные спектры, полученные при возбуждении комплексов ФС I фемтосекундными импульсами с максимумами на разных длинах волн (670, 700 и 720 нм). Было показано, что отношение между количеством возбужденных молекул хлорофилла антенны и РЦ зависит от спектральных характеристик возбуждающего импульса [28]. При возбуждении импульсами с максимумами на 670 и 700 нм регистрация этого процесса в Q_y -полосе хлорофилла маскировалась значительно большим по амплитуде выцветанием, обусловленным возбуждением хлорофиллов антенны. Полученные данные позволили объяснить возможные причины несовпадения результатов исследования кинетики первичных стадий переноса электрона в различных лабораториях. При значительном вкладе возбуждения в антенне трудно обнаружить кинетику начальных этапов переноса электронов между редокс-кофакторами P700, A_0 и A_1 , на фоне переноса энергии к первичному донору электронов.

Молекулы Chl2A/Chl2B и Chl3A/Chl3B, которые образуют первичный акцептор A_0 , характеризуются необычными аксиальными лигандами: водой в случае Chl2A/Chl2B и остатками метионина в случае Chl3A/Chl3B. Остатки метионина (M688PsaA и M668PsaB) сохраняются во всех известных видах растений и цианобактерий. Эти остатки метионина были заменены на лейцин, гистидин и аспарагин [29, 32–34].

Сверхбыстрые оптические измерения показали, что в мутантах по ветви A (M688LPsaA, M688NPsaA и M688HPsaA) наблюдается замедление переноса электрона с A_0 на A_1 , в то время как кинетика в мутантах по ветви B (M668LPsaB, M668NPsaB и M668HPsaB) практически не отличается от кинетики, наблюдавшейся в ФС I из цианобактерий дикого типа [29, 33]. Эти данные указывали на асимметричный вклад ветвей кофакторов A и B в образование вторичной ион-радикальной пары $P700^+A_1^-$. Временноразрешенные исследования спектров ЭПР ФС I из мутантов M688NPsaA и M668NPsaB на частоте 95 ГГц (в W-полосе) при 100 К показали, что кинетика рекомбинации зарядов была аналогична для ФС I из дикого типа и из мутанта по ветви B и существенно отличалась для ФС I из мутанта по ветви A [34]. Анализ модуляций сигнала электронного спинового эха (ESEEM) показал, что расстояния между центрами ион-радикальных пар $P700^+A_1^-$ для образцов ФС I из дикого типа и мутанта по ветви B соответствуют переносу электрона только по ветви A.

Лазерная абсорбционная и ЭПР-спектроскопия продемонстрировали асимметричный вклад кофакторов в ветвях A и B в образование вторичной ион-радикальной пары $P700^+A_1^-$ [29, 32–34]. Анализ модуляций ESEEM при низких температурах показал, что расстояния между центрами ион-радикальных пар $P700^+A_1^-$ в ФС I из дикого типа и из мутанта по B-ветви соответствуют переносу электронов только по ветви A [34]. Сверхбыстрые оптические измерения при комнатной температуре показали, что перенос электронов в ФС I из *Synechocystis* sp. PCC 6803 асимметричен, с вкладом 70–80% по ветви A и от 20 до 30% по ветви B [29].

РЕАКЦИИ СВЕТОЗАВИСИМОГО ОКИСЛЕНИЯ ХИНОНОВ В САЙТЕ A_1

В состав РЦ ФС I входят две молекулы филлохинона (PhQ), характеризующиеся чрезвычайно низким среднеточечным потенциалом ($\sim -700 - -820$ мВ) [27, 35, 36] по сравнению с убихинонами и пластохинонами в сайте связывания Q_A РЦ фотосистемы II и пурпурных бактерий ($\sim -100 - 0$ мВ) [37, 38]. Перспективным подходом к изучению механизмов переноса электронов с участием хинонного кофактора в ФС I является замещение молекулы PhQ в сайте A_1 хинонами с другими среднеточечными редокс-потенциалами (бензохинонами, нафтохинонами и антрахинонами). Это реализуется, в частности, благодаря использованию делеционных мутантов цианобактерий по ферментам биосин-

теза PhQ, в частности, мутанта *menB* [39]. При этом синтез других хинонов у данного мутанта протекает нормально. В освободившийся сайт связывания на место PhQ встраивается пластохинон-9 (PQ), который затем в водной среде в присутствии избытка других хинонов легко ими замещается [40].

Потенциал PQ в сайте A_1 оказался на 95 мВ более положительным, чем потенциал нативного PhQ, что сильно сказалось на кинетике прямого переноса электрона и рекомбинации зарядов [41]. Скорость прямого переноса электрона на железо-серный центр F_x по сравнению с ФС I дикого типа замедлилась в ~1000 раз, а рекомбинация ускорилась в ~25 раз.

Важным преимуществом использования ФС I из мутантного штамма *menB* для исследования механизма переноса электрона с участием хинонов является то обстоятельство, что для замещения PQ в сайте A_1 другими производными хинонов не требуется ни обработки органическими растворителями, ни удаления субъединицы PsaC, ни каких-либо иных химических модификаций, что позволяет свести к минимуму возможные изменения электростатических и конформационных свойств белка. Таким образом, использование *menB* открывает новые возможности для изучения кинетических и термодинамических характеристик переноса электронов в ФС I.

Одним из интересных подходов к изучению механизмов переноса электронов в ФС I с участием хинонов является полное предотвращение электронного транспорта от хинонного акцептора к железо-серным кластерам. Этого можно достигнуть, в частности, путем замещения PQ в сайте A_1 на производное нафтохинона 2,3-дихлор-1,4-нафтохинон (Cl_2NQ), характеризующееся гораздо более положительным среднеточечным редокс-потенциалом. Среднеточечный потенциал Cl_2NQ в диметилформамиде составляет ~ -50 мВ. Это значение является на 400 мВ более положительным, чем аналогичное значение для PhQ. В этом случае электрон оказывается в своеобразной термодинамической ловушке: прямые реакции переноса электронов оказываются энергетически невыгодными, и происходит рекомбинация электрона с хинонным кофактором в сайте A_1 на $P700^+$ (рис. 4).

Кинетики рекомбинации зарядов в ФС I с Cl_2NQ в сайте связывания A_1 , полученные методами импульсной спектродетекции и ЭПР-спектроскопии, демонстрируют существенное уменьшение характерного времени основной кинетической компоненты по сравнению с интактными комплексами из *menB*, содержащими PQ [42]. При комнатной температуре в случае с

Cl_2NQ рекомбинация протекает в ~30 раз быстрее, чем в ФС I из мутанта *menB* и в ~900 раз быстрее по сравнению с ФС I из дикого типа (рис. 4). Кроме того, при регистрации низкотемпературных ЭПР-спектров железо-серных центров F_A/F_B было показано, что, в противоположность интактным комплексам, выделенным из цианобактерий дикого типа и из мутантного штамма *menB*, в ФС I, содержащей Cl_2NQ , не происходит фотовосстановления железо-серных центров. Эти данные свидетельствуют о полном ингибировании переноса электронов от хинонного кофактора к железо-серным кластерам. Кроме того, было продемонстрировано, что при низких температурах только хинон, ассоциированный с А-ветвью редокс-кофакторов в ФС I, задействован в электронном транспорте.

Данные, полученные методом ЭПР-спектроскопии в полосе X в условиях стационарного освещения, показывают, что при замене пластохинона на Cl_2NQ наблюдается почти двукратное снижение сигнала $P700^+$ в ФС I [42]. Это также свидетельствует о резком увеличении вклада обратных реакций в общую кинетику электронного транспорта в ФС I.

Интересно отметить, что в присутствии высоких концентраций аскорбата (5 мМ) при ста-

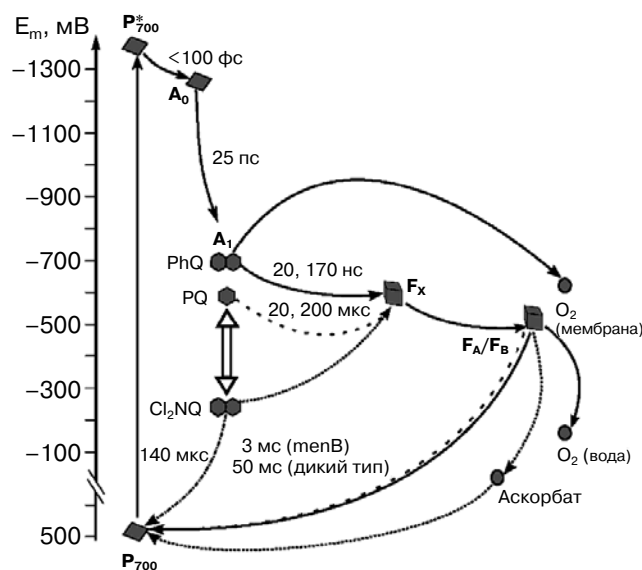


Рис. 4. Термодинамическая схема прямых и обратных реакций в комплексах ФС I дикого типа (PhQ, сплошные стрелки) и мутанта *menB*, содержащего пластохинон (PQ, длинный пунктир) и 2,3-дихлор-1,4-нафтохинон (Cl_2NQ , штрихпунктир) в сайте связывания A_1 . На схеме также показаны сайты восстановления кислорода в ФС I и пути переноса электрона в присутствии высокой концентрации аскорбата (короткий пунктир) в условиях стационарного освещения

ционарном освещении, даже в случае ФС I, содержащей в сайте связывания A_1 Cl_2NQ , становится возможным прямой перенос электронов из сайта A_1 на аскорбат с участием железо-серных центров (рис. 4), о чем свидетельствует увеличение амплитуды ЭПР-сигнала $P700^+$ при добавлении аскорбата [43]. Это происходит благодаря тому, что аскорбат в восстановленном состоянии способен донировать электроны на фотоокисленный $P700^+$, а в окисленном — акцептировать электроны с восстановленных терминальных кластеров F_A/F_B , выступая в роли медиатора циклического транспорта электронов вокруг ФС I.

С другой стороны, нельзя исключать возможности прямого взаимодействия экзогенных акцепторов электронов непосредственно с хинонным кофактором. Так, путем измерения поглощения кислорода в условиях стационарного освещения были получены данные, свидетельствующие в пользу участия хинонного кофактора в восстановлении кислорода на выделенных комплексах ФС I [44]. Показано, что при низких и средних интенсивностях света, скорости поглощения кислорода в ФС I из дикого типа и из *menB* близки и постепенно увеличиваются с увеличением интенсивности света, в то время как при высоких интенсивностях скорость продолжает возрастать в случае ФС I из дикого типа и выходит на плато в случае *menB*. Единственным значимым отличием между дву-

мя исследуемыми системами является потенциал хинона в сайте связывания A_1 , который в случае ФС I из дикого типа (PhQ) является более благоприятным для взаимодействия с кислородом. Авторами была выдвинута гипотеза о том, что в условиях высокой освещенности функционируют два альтернативных пути переноса электрона на кислород: это реакция кислорода с железо-серными центрами и его восстановление от хинонного кофактора в сайте A_1 (рис. 4). Было предположено, что первый процесс реализуется в условиях умеренного освещения, тогда как второй начинает вносить вклад при высоких интенсивностях света.

Таким образом, роль хинонного кофактора в процессах переноса электронов, по-видимому, не ограничивается участием в прямом транспорте от первичного акцептора A_0 к железо-серным кластерам. Есть основания полагать, что молекулы филлохинона A_{1A} и A_{1B} в симметричных ветвях кофакторов А и В в значительной степени обуславливают асимметрию переноса электронов, а также участвуют во взаимодействии с кислородом, предотвращая перевосстановление кофакторов электрон-транспортной цепи ФС I при высокой интенсивности света.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты 15-04-04252, 13-04-40298-Н, 14-04-00519 и 13-04-40299-Н) и РНФ (грант 14-14-00789).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Golbeck, J.H. (ed.) (2006) Photosystem I: the light-driven plastocyanin: ferredoxin oxidoreductase, Springer, Dordrecht.
- Jordan, P., Fromme, P., Witt, H.T., Klukas, O., Saenger, W., and Krauß, N. (2001) Three dimensional structure of Photosystem I at 2.5 Å resolution, *Nature*, **411**, 909–917.
- 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.
- Srinivasan, N., and Golbeck, J.H. (2009) Protein-cofactor interactions in bioenergetics complexes: the role of the A_{1A} and A_{1B} phylloquinones in photosystem I, *Biochim. Biophys. Acta*, **1787**, 1057–1088.
- Shelaev, I.V., Gostev, F.E., Mamedov, M.D., Sarkisov, O.M., Nadochenko, 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.
- Deisenhofer, J., Epp, O., Miki, K., Huber, R., and Michel, H. (1985) Structure of the protein subunits in the photosynthetic reaction centre of *Rhodospseudomonas viridis* at 3 Å resolution, *Nature*, **318**, 618–624.
- Komiyama, H., Yeates, T.O., Rees, D.C., Allen, J.P., and Feher, G. (1988) Structure of reaction center from *Rhodobacter sphaeroides* R-26 and 2.4.1: symmetry reactions and sequence comparison between different species, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 9012–9016.
- Brettel, K., and Leibl, W. (2001) Electron transfer in photosystem I, *Biochim. Biophys. Acta*, **1507**, 100–114.
- Savikhin, S. (2006) Ultrafast optical spectroscopy of photosystem I. In: Photosystem I. The Light-driven plastocyanin: ferredoxin oxidoreductase (Golbeck, J., ed.), *Adv. Photosynth. Resp.*, Springer, Dordrecht, **24**, pp. 155–175.
- Savikhin, S., and Jankowiak, R. (2014) Mechanism of primary charge separation in photosynthetic reaction centers. In: The biophysics of photosynthesis (Golbeck, J., and van der Est, A., eds.), Springer, pp. 193–240.
- Brettel, K. (1988) Electron transfer in photosystem I, *FEBS Lett.*, **239**, 93–98.
- Setif, P., and Bottin, H. (1989) Identification of electron-transfer reactions involving the acceptor A_1 of photosystem I at room temperature, *Biochemistry*, **28**, 2689–2697.
- Karapetyan, N.V., Schlodder, E., van Grondelle, R., and Dekker, P. (2006) In: Photosystem I. The Light-driven plastocyanin: ferredoxin oxidoreductase (Golbeck, J., ed.), Springer, Dordrecht, pp. 177–192.
- Shuvalov, V.A., Nuijs, A.M., van Gorkom, H.J., Smit, H.W.J., and Duysens, L.N. (1986) Picosecond absorbance changes upon selective excitation of the primary electron donor P700 in photosystem I, *Biochim. Biophys. Acta*, **850**, 319–323.

15. Hastings, G., Kleinherenbrink, F.A., Lin, S., McHugh, T.J., and Blankenship, R.E. (1994) Observation of the reduction and reoxidation of the primary electron acceptor in photosystem I, *Biochemistry*, **33**, 3193–3200.
16. Savikhin, S., Xu, W., Martinsson, P., Chitnis, P.R., and Struve, W.S. (2001) Kinetics of charge separation and $A_0 \rightarrow A_1$ electron transfer in photosystem I reaction centers, *Biochemistry*, **40**, 9282–9290.
17. Kumazaki, S., Ikegami, I., Furusawa, H., Yasuda, S., and Yoshihara, K. (2001) Energy equilibration among the chlorophylls in the electron-transfer system of photosystem I reaction center from spinach, *J. Phys. Chem. B*, **105**, 1093–1099.
18. Wasielewski, M.R., Fenton, J.M., and Govindjee. (1987) The rate of formation of P700(+)-A0(-) in photosystem I particles from spinach as measured by picosecond transient absorption spectroscopy, *Photosynth. Res.*, **12**, 181–189.
19. Nuijs, A.M., Shuvalov, V.A., van Gorkom, H.J., Plijter, J.J., and Duysens, L.N.M. (1986) Picosecond absorbance difference spectroscopy on the primary reactions and the antenna-excited states in Photosystem I particles, *Biochim. Biophys. Acta*, **850**, 310–318.
20. Savikhin, S., Xu, W., Chitnis, P.R., and Struve, W.S. (2000) Ultrafast primary processes in PS I from *Synechocystis* sp. PCC 6803: roles of P700 and A(0), *Biophys. J.*, **79**, 1573–1586.
21. White, N.T.H., Beddard, G.S., Thorne, J.R.G., Tim, M., Feehan, T.M., Keyes, T.E., and Heathcote, P. (1996) Primary charge separation and energy transfer in the photosystem I reaction center of higher plants, *J. Phys. Chem.*, **100**, 12086–12099.
22. Melkozernov, A.N., Lin, S., and Blankenship, R.E. (2000) Excitation dynamics and heterogeneity of energy equilibration in the core antenna of photosystem I from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Biochemistry*, **39**, 1489–1498.
23. Gobets, B., and van Grondelle, R. (2001) Energy transfer and trapping in photosystem I, *Biochim. Biophys. Acta*, **1507**, 80–99.
24. Muller, M.G., Niklas, J., Lubitz, W., and Holzwarth, A.R. (2003) Ultrafast transient absorption studies on Photosystem I reaction centers from *Chlamydomonas reinhardtii*. 1. A new interpretation of the energy trapping and early electron transfer steps in Photosystem I, *Biophys. J.*, **85**, 3899–3922.
25. Holzwarth, A.R., Muller, M.G., Reus, M., Nowaczyk, M., Sander, J., and Rogner, M. (2006a) Kinetics and mechanism of electron transfer in intact photosystem II and in the isolated reaction center: Pheophytin is the primary electron acceptor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 6895–6900.
26. Holzwarth, A.R., Muller, M.G., Niklas, J., and Lubitz, W. (2006b) Ultrafast transient absorption studies on photosystem I reaction centers from *Chlamydomonas reinhardtii*. 2: Mutations near the P700 reaction center chlorophylls provide new insight into the nature of the primary electron donor, *Biophys. J.*, **90**, 552–565.
27. Ptushenko, V.V., Cherepanov, D.A., Krishtalik, L.I., and Semenov, A.Y. (2008) Semicontinuum electrostatic calculations of redox potentials in photosystem I, *Photosynth. Res.*, **97**, 55–74.
28. Semenov, A.Y., Shelaev, I.V., Gostev, F.E., Mamedov, M.D., Shuvalov, V.A., Sarkisov, O.M., and Nadochenko, V.A. (2012) Primary steps of electron and energy transfer in photosystem I: Effect of excitation pulse wavelength, *Biochemistry (Moscow)*, **77**, 1011–1020.
29. Sun, J., Hao, S., Raddle, M., Xu, W., Shelaev, I., Nadochenko, V., Shuvalov, V., Semenov, A., Gordon, H., van der Est, A., and Golbeck, J.H. (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 M688HPsaA and M688HPsaB variants of *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Biochim. Biophys. Acta*, **1837**, 1362–1375.
30. Macomber, G.D. (1976) The dynamics of spectroscopic transition, John Wiley and Sons, N.Y., London, Sydney, Toronto.
31. Shuvalov, A. (1984) Main features of the primary charge separation in photosynthetic reaction centers. In: *Advances in Photosynthesis Research* (Sybesma, C., ed.), The Hague, Boston, Lancaster, pp. 93–100.
32. Cohen, R.O., Shen, G., Golbeck, J.H., Xu, W., Chitnis, P.R., Valieva, A.I., van der Est, A., Pushkar, Y., and Stehlik, D. (2004) Evidence for asymmetric electron transfer in cyanobacterial photosystem I: analysis of a methionine-to-leucine mutation of the ligand to the primary electron acceptor A_0 , *Biochemistry*, **43**, 4741–4754.
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 A_0 , *Biophys. J.*, **88**, 1238–1249.
34. Savitsky, A., Gupta, O., Mamedov, M., Golbeck, J.H., Tikhonov, A., Moebius, K., and Semenov, A. (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. Magn. Reson.*, **37**, 85–102.
35. Vos, M.H., and Van Gorkom, H.J. (1990) Thermodynamical and structural information on photosynthetic systems obtained from electroluminescence kinetics, *Biophys. J.*, **58**, 1547–1555.
36. 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.
37. Krieger, A., Rutherford, A.W., and Johnson, G.N. (1995) On the determination of redox potential of the primary quinone electron acceptor, Q_A , in photosystem II, *Biochim. Biophys. Acta*, **1229**, 193–201.
38. Wraight, C.A. (1981) Oxidation-reduction physical chemistry of the acceptor quinone complex in bacterial photosynthetic reaction centers: evidence for a new model of herbicide activity, *Israel J. Chem.*, **21**, 348–354.
39. Johnson, T.W., Zybailov, B., Jones, A.D., Bittl, R., Zech, S., Stehlik, D., Golbeck, J.H., and Chitnis, P.R. (2001) Recruitment of a foreign quinone into A1 site of photosystem I: *in vivo* replacement of plastoquinone-9 by media-supplemented naphthoquinones in phylloquinone biosynthetic pathway mutants of *Synechocystis* sp. PCC 6803, *J. Biol. Chem.*, **276**, 39512–39521.
40. van der Est, A., Pushkar, Yu., Karyagina, I., Fonovic, B., Dudding, T., Niklas, J., Lubitz, W., and Golbeck, J.H. (2010) Incorporation of 2,3-Disubstituted-1,4-Naphthoquinones into the A1 binding site of photosystem I studied by EPR and ENDOR Spectroscopy, *Appl. Magn. Reson.*, **37**, 65–83.
41. Semenov, A.Yu., Vassiliev, I.R., van der Est, A., Mamedov, M.D., Zybailov, B., Shen, G.Z., Stehlik, D., Diner, B.A., Chitnis, P.R., and Golbeck, J.H. (2000) Recruitment of a Foreign Quinone into the A1 Site of Photosystem I: altered kinetics of electron transfer in phylloquinone biosynthetic pathway mutants studied by time-resolved optical, EPR, and electrometric techniques, *J. Biol. Chem.*, **275**, 23429–23438.
42. Mula, S., Savitsky, A., Mobius, K., Lubitz, W., Golbeck, J.H., Mamedov, M.D., Semenov, A.Yu., 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**, 946–956.
43. Trubitsin, B.V., Mamedov, M.D., Semenov, A.Yu., and Tikhonov, A.N. (2014) Interaction of ascorbate with photosystem I. *Photosynth Res.*, **122**, 215–231.
44. Kozuleva, M.A., Petrova, A.A., Mamedov, M.D., Semenov, A.Yu., and Ivanov, B.N. (2014) O₂ reduction by photosystem I involves phylloquinone under steady-state illumination, *FEBS Lett.*, **588**, 4364–4368.

ELECTRON TRANSFER WITHIN PHOTOSYSTEM I CONTAINING NATIVE AND MODIFIED QUINONE ACCEPTORS

A. Yu. Semenov^{1,2*}, A. A. Petrova¹,
M. D. Mamedov¹, V. A. Nadtochenko²

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

² N. N. Semenov Institute of Chemical Physics, Russian Academy
of Sciences, Moscow 119991, Russia;
fax: +7(499)137-8357

Received January 27, 2015

Revision received March 8, 2015

Pigment–protein complex of photosystem I (PS I) catalyzes the light-driven oxidation of plastocyanin or cytochrome c₆ and reduction of ferredoxin or flavodoxin in oxygenic photosynthetic organisms. In this review, we describe the current state of knowledge of the processes of excitation energy transfer and the formation of the primary and secondary ion-radical pairs within PS I. The electron transfer reaction involving quinone cofactor in the A₁ site and its role in providing the asymmetry of the electron transport as well as interaction with oxygen and ascorbate in PS I are discussed.

Key words: photosystem I, reaction center, electron transfer, asymmetry, primary reactions, quinone acceptors, interaction with oxygen and ascorbate