

VILNIAUS UNIVERSITETAS

FIZINIŲ IR TECHNOLOGIJOS MOKSLŲ CENTRAS

JEVGENIJ CHMELIOV

SUŽADINIMO EVOLIUCIJA IR SAVIREGULIACIJOS GEBA  
FOTOSINTETINĖSE ŠVIESĄ SURENKANČIOSE SISTEMOSE

Daktaro disertacijos santrauka  
Fiziniai mokslai, fizika (02P)

Vilnius, 2015 metai

Disertacija rengta 2011 – 2015 metais Vilniaus universitete

**Mokslinis vadovas:**

prof. habil. dr. Leonas Valkūnas (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, fizika – 02P).

**Disertacija ginama Vilniaus universiteto Fizikos mokslo krypties taryboje:**

**Pirmininkas** – prof. habil. dr. Saulius Antanas Juršėnas (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, fizika – 02P).

**Nariai:**

dr. Maxim F. Gelin (Miuncheno technikos universitetas, Vokietija, fiziniai mokslai, fizika – 02P);

prof. habil. dr. Vytautas Balevičius (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, fizika – 02P);

prof. habil. dr. Algirdas Matulis (Fizinių ir technologijos mokslų centras, fiziniai mokslai, fizika – 02P);

doc. dr. Saulius Bagdonas (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, fizika – 02P).

Disertacija bus ginama viešame Fizikos mokslo krypties tarybos posėdyje 2015 m. gruodžio mėn. 1 d. 15 val. Fizikos fakulteto Fizikos fakulteto 212 auditorijoje.

Adresas: Saulėtekio al. 9 / III rūmai, Vilnius, Lietuva.

Disertacijos santrauka išsiuntinėta 2015 m. lapkričio mėn. 2 d.

Disertaciją galima peržiūrėti Vilniaus universiteto ir Fizinių ir technologijos mokslų centro bibliotekose bei VU interneto svetainėje adresu:

[www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius](http://www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius).

VILNIUS UNIVERSITY

CENTER FOR PHYSICAL SCIENCES AND TECHNOLOGY

JEVGENIJ CHMELIOV

EXCITATION EVOLUTION AND SELF-REGULATION ABILITY  
OF PHOTOSYNTHETIC LIGHT-HARVESTING SYSTEMS

Summary of doctoral dissertation  
Physical sciences, Physics (02P)

Vilnius, 2015

Doctoral dissertation was prepared at Vilnius University in 2011 – 2015, Vilnius, Lithuania

**Scientific supervisor:**

prof. habil. dr. Leonas Valkūnas (Vilnius University, Physical sciences, Physics – 02P).

**Doctoral dissertation will be defended in the Council of Physics of Vilnius University:**

**Chairman** – prof. habil. dr. Saulius Antanas Juršėnas (Vilnius University, Physical sciences, Physics – 02P).

**Members:**

dr. Maxim F. Gelin (Technische Universität München, Germany, Physical sciences, Physics – 02P);

prof. habil. dr. Vytautas Balevičius (Vilnius University, Physical sciences, Physics – 02P);

prof. habil. dr. Algirdas Matulis (Center for Physical Sciences and Technology, Physical sciences, Physics – 02P);

doc. dr. Saulius Bagdonas (Vilnius University, Physical sciences, Physics – 02P).

The official defense of the dissertation will be held at 3 p.m. on 1 December 2015 in 212 auditorium at the Faculty of Physics of Vilnius University.

Address: Saulėtekio ave. 9, bldg. 3, Vilnius, Lithuania.

Summary of the dissertation was distributed on 2 November 2015.

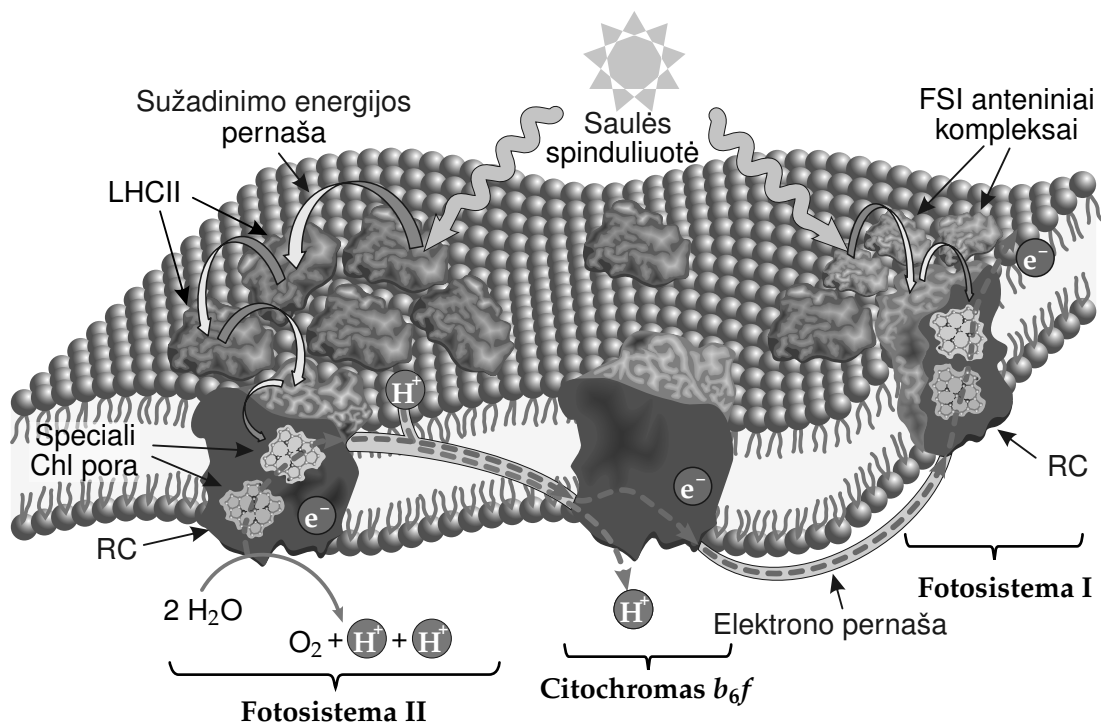
The dissertation is available at the libraries of Vilnius University and Center for Physical Sciences and Technology, and at the VU website:

[www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius](http://www.vu.lt/lt/naujienos/ivykiu-kalendorius).

## Ižanga

Visą mūsų planetos vystymosi laikotarpį Saulė buvo ir išlieka pagrindinis energijos šaltinis visiems Žemės organizmams. Įvertinama, jog to energijos kiekio, kuris šviesos ir šilumos pavidalu pasiekia Žemės paviršių per vieną parą, užtektų maždaug dviem dešimtmečiams visai įmanomai žmonijos veiklai palaikyti [1]. Dalis šios energijos yra sugerama ir vėliau išsaugoma cheminių ryšių energijos pavidalu vykstant vienam svarbiausių gyvųjų organizmų metabolinių procesų – *fotosintezei*. Žalieji augalai, dumbliai bei melsvabakterės yra ne tik atsakingi už biomasės gamybos pirmąjį etapą, bet kartu papildo deguonies atsargas mūsų atmosferoje. Fotosintezės „deguonies gamyklos“ yra paslėptos giliai augalų ląstelėse – chloroplastuose esančiose tilakoidų membranose. Pastarąsias sudaro dvigubas lipidų sluoksnis su jame išsidėsčiusiais įvairių rūšių baltymais (žr. 1 pav.). Didžioji jų dauguma – vadinamosios pirmoji (FSI) ir antroji (FSII) fotosistemos kartu su savo periferinėmis šviesos surinkimo antenomis – atsako už šviesos sugertį ir sužadavimo energijos pernašą į fotosistemos centre esantį reakcijų centrą (RC), kuriame sugerto fotono energija panaudojama krūviams atskirti. Šio vyksmo metu antroje fotosistemoje vyksta vandens fotolizė bei išsiskiria molekulinis deguonis.

Abi fotosistemas sudarančių pigmentų – chlorofilų ir karotenoidų – spektroskopinės savybės bei šių molekulių tarpusavio išsidėstymas užtikrina optimalią šviesos sugertį ir ypatingai našią (iki 99 %) elektroninių sužadavimų pernašą į reakcijų centrą [2]. Tačiau nepaisant intensyvių kelis pastaruosius dešimtmečius vykstančių tyrimų (apžvelgtų, pvz., [3–8] darbuose), tokio neįtikėtino našumo prigimtis vis dar nėra iki galo aiški. Šis reiškinys pasidaro dar mažiau suprantamas, kai atsižvelgiama į visoms biologinėms sistemoms būdingą vidinę netvarką ir tilakoidų membranose nuolat vykstančius dinامينius pokyčius [7, 9]. Kita vertus, toks didelis našumas, leidžiantis fotosintetiniam organizmui išgyventi ir sėkmingai vystytis mažo apšvietimo sąlygomis (pvz., vandenyje arba nuolatiniame šešėlyje), gali turėti neigiamų pasekmių staiga padidėjus krintančios šviesos intensyvumui. Kadangi RC veikimo sparta visgi yra baigtinė, labai ryškioje šviesoje nespėjama panaudoti visų sugertų fotonų energijos. Chlorofilo molekulei ilgiau būnant sužadintos būsenos stipriai išauga tikimybė susidaryti singuletiniam



**1 pav.** | Schematinė tilakoidų membranos sandara. Pirmosios ir antrosios fotosistemų (FSI ir FSII) reakcijų centrus supa periferiniai šviesą sugeriantys pigmentų ir baltymų kompleksai. Kai kurie iš jų turi silpnesnį ryšį su RC ir esant poreikiui gali nudifunduoti per membraną nuo vienos fotosistemos prie kitos. Vandens oksidacija bei molekulinio deguonies gamyba vyksta FSII reakcijų centre; citochromas  $b_6f$  yra dar vienas tilakoidų membranose aptinkamas baltymas, dalyvaujantis elektrono pernašoje iš FSII į FSI.

deguoniui bei laisviesiems radikalams, kurie gali „sudeginti“ visą fotosistemą.

Kad būtų išvengta tokių neigiamų pasekmių, per milijonus evoliucijos metų augalai išvystė skirtingus savireguliacijos mechanizmus, leidžiančius kontroliuoti pusiausvyrą tarp sugeriamos ir fotosintezei panaudojamos sužadinimo energijos kiekio [10]. Pirma, pats reakcijų centras geba prisitaikyti prie besikeičiančių apšvietimo sąlygų ir reguliuoti krūvių atskyrimo vyksmą [11, 12]. Be to, egzistuoja įvairių grįžtamųjų reguliacinių procesų, vykstančių šviesos surinkimo antenoje ir visą perteklinę sužadinimo energiją išsklaidančių šilumos pavidalu. Pagrindinis nefotocheminiu gesimu (NPQ, *angl.* non-photochemical quenching) vadinamas fotoapsaugos mechanizmas pasireiškia molekulinio lygmeniu ir grįžtamai įsijungia vos per kelias minutes staiga sustiprėjus apšvietimui [10]. Yra žinoma, jog greičiausiai NPQ veikia augalų pagrindiniuose šviesą surenkančiuose kompleksuose – LHCII – ir tikriausiai jame dalyvauja karotenoidų molekulės. Egzistuoja keli šį savisaugos būdą aiškinantys mikroskopiniai modeliai [13–17], tačiau tikslūs jo veikimo mechanizmai iki šiol dar nėra nustatyti.

Tobulėjant eksperimentinei įrangai ir tyrimuose taikomiems metodams, šiandien vis daugiau dėmesio skiriama palyginti naujai, įvairių mokslo šakų sankirtoje susiformavusiai sričiai, kuri bando nustatyti, kaip fotosintezės metu veikia šviesos sugertis ir energijos pernaša bei kokie yra molekuliniai NPQ mechanizmai. Nepaisant intensyvių pastaruosius du dešimtmečius vykstančių tyrimų, į šiuos klausimus vis dar nėra atsakyta. Tačiau yra nustatyta, jog, pvz., racionaliai vykdoma NPQ proceso kontrolė galėtų padidinti augalų derlingumą iki 30 % [18]. Šis pavyzdys demonstruoja, kokios taikymo perspektyvos atsiveria iki galo supratus ir išmokus valdyti augaluose vykstančią fotosintezę bei nefotocheminį gesimą. Šiuolaikinis mokslas jau žengė pirmuosius žingsnius dirbtinės fotosintezės link: buvo sėkmingai pabandyta atkartoti reakcijų centrų [19–21], šviesos surinkimo antenos [21,22], vandenį skaldančių kompleksų [23–25] ar net abiejų fotosistemų tandemą [26–29] funkcionalumą. Nepaisant to, dar nemažai lieka padaryti norint bent priartėti prie tokio fotosintezės našumo, kuris per milijonus evoliucijos metų išsivystė augaluose bei fotosintetinėse bakterijose.

### **Pagrindinis disertacijos tikslas ir uždaviniai**

Pagrindinis šioje disertacijoje pristatytų tyrimų **tikslas** yra ištirti sužadinimo energijos dinamiką įvairiose fotosintetinėse sistemose, pasižyminčiose skirtingais struktūrinės organizacijos lygiais: nuo tarpmolekulinių sąveikų vieno pigmentų ir baltymų komplekso viduje iki dideliuose LHCII trimerų agregatuose, įvairaus dydžio fotosistemose ar net ištisoje tilakoidų membranoje vykstančių reiškinių, – ypatingą dėmesį skiriant savireguliacijos ypatumams. Šiam tikslui pasiekti yra suformuluojami keli uždaviniai:

- Apskaičiuoti sužadinimo energijos pernašos spartas tarp LHCII monomere aptinkamų įvairių pigmentų ir tokiu būdu įvertinti skirtingų karotenoidų efektyvumą gesinant perteklinę sužadinimo energiją.
- Išvystyti teorinius modelius, aprašančius pavieniuose LHCII kompleksuose stebimus trūkinėjančiosios fluorescencijos bei singuletinių ir tripletinių būsenų anihiliacijos reiškinius.
- Analizuojant LHCII trimerų ir agregatų fluorescencijos spektrų priklausomybę nuo laiko ir temperatūros nustatyti LHCII kompleksams būdingų skirtingų būsenų molekulinę prigimtį.
- Sukurti fliuktuojančiosios antenos teorinį modelį, kuris paaikšintų skirtingo-

se fotosintetinėse sistemose stebimas daugiaekspontentes fluorescencijos gesimo kinetikas.

- Išanalizuoti fluorescencijos indukcijos kinetikas tilakoidų membranose bei įvertinti grįžtamuosius struktūrinius makroskopinius pokyčius, vykstančius joje staiga pasidėjusio apšvietimo sąlygomis.

## **Ginamieji teiginiai**

1. Sužadavimo nefotocheminio gesinimo būseną yra viena iš kelių LHCII kompleksui būdingų būsenų, į kurią šviesą surenkantis kompleksas gali spontaniškai pereiti dėl baltymo lėtą konformacinių pokyčių. Bet koks išorinis poveikis moduliuoja LHCII komplekso daugiamatį potencinės energijos paviršių tokiu būdu nukreipdamas dinaminę pusiausvyrą link vienos iš kelių apibrėžtų būsenų.
2. Galima išskirti mažiausiai tris LHCII kompleksui būdingas vidinės būsenas. Dominuojančioji būseną pasižymi stipriu fluorescencijos spektro pikų 680 nm srityje. Kita spinduliuojančioji būseną, kuriai būdingas fluorescencijos spektro poslinkis link didesnių bangos ilgių, atsiranda dėl eksitoninių ir chlorofilo–chlorofilo atskirtų krūvių būsenų susimaišymo. Už nefotocheminį gesimą atsakingos būsenos prigimtis yra nekoherentinė sužadavimo energijos pernaša iš chlorofilo į trumpai gyvuojančią karotenoido (greičiausiai liuteino) sužadintą būseną.
3. Šviesos surinkimo antenos dinaminis padidėjimas po trumpalaikio prisitaikymo prie suintensyvėjusio apšvietimo užtikrina geresnę fotoapsaugą – didesnė antena atitinkamai padidina tikimybę, jog kuris nors iš jos baltyminių kompleksų pereis į NPQ būseną. Kita vertus, išaugusi antena taip pat kompensuoja dėl NPQ susilpnėjusią sužadavimo pernašą į atvirus reakcijų centrus. Tokiu būdu lėtosios NPQ gaudyklės, galinčios atsitiktinai atsirasti bet kurioje antenos vietoje, suteikia augalui lanksčias galimybes laipsniškai reguliuoti nefotocheminio gesimo efektyvumą nepadarant žalos bendram fotosintezės našumui.
4. Įvairiose fotosintetinėse sistemose – pavieniuose LHCII trimieruose ar jų agregatuose, skirtingo dydžio fotosistemose ar net ištisose tilakoidų membranose – stebimos daugiaekspontentes fluorescencijos gesimo kinetikos atsiranda dėl antenoje vykstančių dinaminėlių fliktuacijų, o ne eksitonų ir sužadavimo gaudyklės radikalų porų pusiausvyros nusistovėjimo.



## Darbo naujumas ir aktualumas

Nepaisant pastaruosius dešimtmečius vykstančių intensyvių tyrimų siekiant atskleisti sužadinimo energijos pernašos fotosintetiniuose anteniniuose kompleksuose ypatumus bei nefotocheminio gesimo prigimtį, galutinį tašką šiuose tyrimuose dėti yra dar per anksti. Šioje disertacijoje yra nuodugniai ištirti keli šių klausimų aspektai, o atliktų teorinių tyrimų rezultatai leido paaiškinti įvairius eksperimentuose stebimus reiškinius. Antrame ir ketvirtame disertacijos skyriuose yra suformuluojami ir išvystomi teoriniai modeliai, kurie leido suprasti pavieniuose LHCII kompleksuose vykstančią trūkinėjančiąją fluorescenciją bei singuletinių ir tripletinių būsenų netiesinę anihiliaciją. Pasiūlyti modeliai taip pat suteikė galimybę kitaip pažiūrėti į jau seniai stebimų daugiaeksponenčių fluorescencijos gesimo kinetikų prigimtį. Pirmame skyriuje apskaičiuotų sužadinimo energijos pernašos iš chlorofilų į karotenoidus spartų pagrindu yra įvertinamos skirtingų karotenoidų indėlis į bendrą nefotocheminį gesinimą. Trečiame disertacijos skyriuje yra pateikta išmatuotų fluorescencijos spektrų analizė, kurios pagrindu buvo atskleistos kelios LHCII kompleksui būdingos vidinės būsenos bei nustatyta kiekvienos būsenos molekulinė prigimtis. Apibendrinant pirmųjų trijų skyrių rezultatus galima daryti išvadą, jog pagaliau pavyko nustatyti NPQ molekulinį mechanizmą – jį nusako nekoherentinė sužadinimo energijos pernaša iš chlorofilo molekulės į šalia esančio liuteino trumpai gyvuojančią sužadintą būseną. Pagaliau, penkto skyriaus rezultatai pateikė atsakymą į kitą fotosintezės tyrimų srityje ilgai gyvavusį klausimą apie NPQ sąlygomis tilakoidų membranoje vykstančius dinaminius makroskopinius pokyčius.

## Darbo rezultatų pristatymas mokslinei visuomenei

Disertacijos darbo rezultatai buvo pristatyti aštuoniose mokslinėse publikacijose, paskelbtose referuojamuose ir Mokslinės informacijos instituto duomenų bazėje „ISI Web of Science“ citavimo indeksą turinčiuose žurnaluose; dar viena publikacija šiuo metu yra recenzuojama. Pažymėtina, jog disertacijos autorius taip pat yra septynių kitų, šioje disertacijoje neatspindėtų publikacijų bendraautorius. Per doktorantūros studijų laikotarpį autorius disertacijos rezultatus pristatė 12 mokslinių konferencijų. Publikacijų ir konferencijų sąrašas pateikiamas Santraukos gale.

## **Disertacijos sandara**

Disertaciją sudaro įvadinis ir penki pagrindiniai skyriai. Įvadiniame skyriuje trumpai apibūdinama disertacijoje nagrinėjama problema bei pristatomos šios tyrimų srities perspektyvos, suformuluojamas darbo tikslas, uždaviniai ir ginamieji teiginiai, pateikiamas autoriaus išspausdintų publikacijų bei konferencijose pristatytų pranešimų sąrašas. Pirmame disertacijos skyriuje pateikiama informacija apie tyrimo objekto struktūrą ir šiuo metu nagrinėjamas hipotezes dėl nefotocheminio gesimo prigimties; vėliau pristatomi struktūriniais duomenimis pagrįsti modeliavimo rezultatai. Kituose keturiuose skyriuose trumpai pristatomi aktualūs eksperimentiniai darbai, po kurių suformuluojami šiuos eksperimentus aprašantys teoriniai modeliai bei pateikiami originalių modeliavimų rezultatai. Disertacija užbaigiama trumpu visus rezultatus apibendrinančiu skyriumi, po kurio yra pateikiamas cituojamos literatūros sąrašas.

## **Pagrindinių šviesą surenkančių kompleksų mikroskopinė sandara ir jų atliekamos funkcijos**

Yra žinoma, jog augalų pagrindiniuose šviesą surenkančiuose kompleksuose yra sutelkta virš 50 % visų Žemės paviršiuje aptinkamų chlorofilo molekulių [30]. Pirmasis disertacijos skyrius prasideda nuo šių kompleksų vidinės sandaros [31] bei juos sudarančių pigmentų – chlorofilų ir karotenoidų – pagrindinių savybių aptarimo. Skyriaus antroje dalyje pateikiama informacija apie sužadavimo nefotocheminio gesimo reiškinių bei vykdytus tyrimus jo savybėms atskleisti. Trečioje dalyje yra aptariamos neseniai kvantinės chemijos metodais gautos visų LHCII komplekse esančių chlorofilų ir karotenoidų sąveikos energijos bei trumpai pristatoma šiandien plačiai taikoma Försterio teorija tarpmolekulinės sužadavimo pernašos spartoms skaičiuoti [32–34]. Remiantis šia teorija buvo atlikti skaičiavimai, apibendrinti 1 lentelėje. Nustačius sužadavimo pernašos tarp įvairių pigmentų trukmes, buvo įvertintas kiekvieno karotenoido efektyvumas jam vidinės konversijos būdu paverčiant sužadavimo energiją į šilumą. Iš 2 lentelėje pateiktų rezultatų matyti, jog LHCII monomero centre išsidėstę liuteino pigmentai sužadavimo „gesiklio“ vaidmenį atlieka efektyviausiai, o vidutinė sužadavimo gyvavimo trukmė LHCII komplekse sumažėja nuo ~4 ns (kai nėra pernašos iš chlorofilų į karotenoidus) iki ~65 ps (kai ši pernaša yra aktyvi). Tokiu būdu yra parodyta, jog ankstesnių teorinių modelių, nagrinėjančių tarpmolekulinę sužadavimo energijos pernašą LHCII kompleksuose, praplėtimas ir karotenoidų poveikio įskaitymas lei-

**1 lentelė** | Apskaičiuotos sužadavimo pernašos trukmės (pikosekundėmis) tarp įvairių LHCII komplekse aptinkamų pigmentų. Ilgesnės nei 1 ns trukmės nėra rodomos.

Pigmentas	Chlb601	Chla602	Chla603	Chla604	Chlb605	Chlb606	Chlb607	Chlb608	Chlb609	Chla610–611–612	Chla613–614	Lut620	Lut621	Vio622	Neo623
Chlb601	–	26,8	–	–	–	147	476	460	57,9	–	–	–	–	–	–
Chla602	2,7	–	1,7	17,5	–	97,8	38,5	39,3	17,8	8,4	26,8	–	–	–	–
Chla603	236	1,1	–	15,7	–	65,5	–	140	3,0	10,7	24,9	–	–	–	–
Chla604	–	9,7	13,5	–	–	1,2	7,2	327	341	35,4	90,4	–	–	–	–
Chlb605	–	–	–	–	–	4,0	–	224	–	–	–	–	–	–	–
Chlb606	133	869	906	19,8	2,7	–	5,8	123	2,1	–	–	–	–	–	–
Chlb607	197	156	–	52,7	587	2,6	–	40,0	19,1	923	–	–	–	–	–
Chlb608	181	151	846	–	65,7	53,8	38,1	–	4,2	18,1	–	–	–	–	–
Chlb609	81,7	245	64,9	–	–	3,2	65,2	14,9	–	–	–	–	–	–	–
Chla610–611–612	48,9	2,2	4,1	15,1	323	65,0	71,9	1,4	317	–	4,4	–	–	–	–
Chla613–614	168	11,9	13,3	57,5	–	964	176	625	–	6,9	–	–	–	–	–
Lut620	–	–	–	–	–	–	–	–	–	61,5	498	–	–	–	–
Lut621	–	349	23,0	91,5	–	707	762	–	–	–	–	–	–	–	–
Vio622	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	255	–	–	–	–
Neo623	–	–	–	177	–	189	–	293	–	–	–	–	–	–	–

**2 lentelė** | Nustatytos karotenoidų  $S_1$  būsenos energijos, atitinkančios greičiausiai (vidutinė gyvavimo trukmė  $\tau = 65$  ps) sužadavimo gesimą LHCII monomere, ir šių karotenoidų kaip sužadavimo gesiklių efektyvumo (kvantinių išieigų) palyginimas.

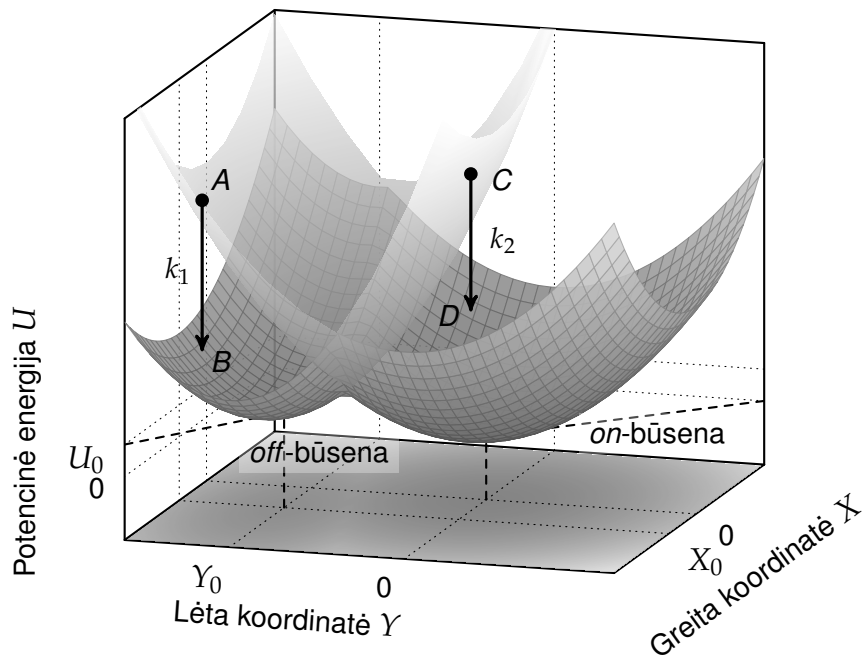
Karotenoidas	$S_1$ būsenos energija	Gesimo kvantinė išieiga
Luteinas620	14 950 $\text{cm}^{-1}$	0,37
Luteinas621	14 890 $\text{cm}^{-1}$	0,49
Violaksantinas622	14 880 $\text{cm}^{-1}$	0,06
Neoksantinas623	14 940 $\text{cm}^{-1}$	0,07

do paaiškinti LHCII kristaluose stebimą žymiai greitesnę fluorescencijos intensyvumo gesimą lyginant su matavimais LHCII tirpaluose [14]. Tačiau pagrindiniai klausimai – kas lemia energijos pernašos iš chlorofilo į karotenoidą aktyvaciją bei ar *in vivo* matavimuose stebimo NPQ reiškinio prigimtis yra tokia pati, kaip ir LHCII kristaluose – lieka neatsakyti. Šie klausimai detalčiau nagrinėjami kituose disertacijos skyriuose.

## Pavienių LHCII kompleksų spektroskopinės savybės

Disertacijos antrajame skyriuje nagrinėjami reiškiniai, stebėti pavienių molekulių spektroskopijos metodus pritaikius atskiriems LHCII trimerams tirti. Skyriaus pradžioje pateikiama šių metodų bei stebimų reiškinų, tokių kaip trūkinėjančioji fluorescencija [35,36] bei spektro difuzija [37], apžvalga. Akcentuojama, jog struktūriškai labai sudėtinguose ir ypatingai svarbią biologinę funkciją atliekančiuose LHCII kompleksuose stebimi efektai ir jų dėsningumai yra tokie patys, kaip ir žymiai paprastesnėse dažiklių molekulėse ar vadinamuosiuose puslaidininkiniuose kvantiniuose taškuose [38]. Antroje skyriaus dalyje yra suformuluojamas teorinis modelis, kuris paaiškina eksperimentuose stebėtas atsitiktines fluorescencijos intensyvumo fliuktuacijas esant pastoviam žadanimui. Šio modelio idėja schematiškai pavaizduota 2 pav. Apibendrinant eksperimentuose stebėtus reiškinius, galima teigti, jog, priklausomai nuo LHCII komplekso baltymo struktūros išsidėstymo, šis kompleksas gali būti vienos iš dviejų galimų būsenų, šuolius tarp kurių nusako lėtai vykstantys nežymūs baltyminio LHCII „karkaso“ pokyčiai.

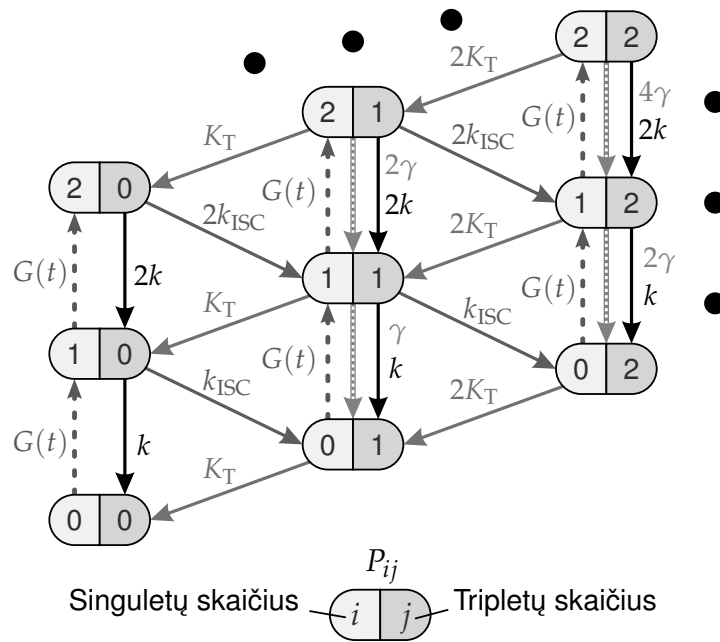
Yra gerai žinoma, jog fotosintezėje dalyvaujančių pigmentų spektrinės savybės labai stipriai priklauso nuo jų aplinkos; net nežymūs atstumų tarp pigmentų ar jų tarpusavio orientacijos pokyčiai, baltymo aminorūgščių (de)protonavimas ir panašūs veiksniai pakeičia tarpmolekulinės sąveikos stiprumą, tad ir sužadavimo pernašos spartą. Taigi natūralu manyti, jog LHCII kompleksui galima priskirti bent dvi stabilias konformacijas: vienoje jų (šviesinėje) sąveika tarp chlorofilo ir liuteino (ar kito gesiklio) molekulių yra nykstamai maža, todėl susidaręs sužadinimas užgesta lėtai (per ~4 ns), duodamas stiprų fluorescencijos signalą. Dėl vidinių fliuktuacijų nežymiai pasikeitus baltymo struktūrai, aktyvuojama sužadavimo energijos pernaša į komplekse esantį sužadavimo gesiklį (pvz., liuteiną), dėl to staigiai krenta fluorescencijos intensyvumas – LHCII kompleksas pereina į tamsinę būseną. Išanalizavus difuziją lėtai kintančios apibendrintosios koordinatės Y (nusakančios baltymo konfigūracijos pokyčius) ir greitai fliuktuojančios apibendrintosios koordinatės X (apibūdinančius molekulinis virpesius apie kiekvienos – šviesinės ar tamsinės – būsenos potencinės energijos minimumą) fazinėje erdvėje, nustatyti šuolių tarp abiejų būsenų tikimybiniai pasiskirstymai puikiai atitiko eksperimento rezultatus. Ištyrus šuolių tarp būsenų ypatumus esant skirtingiems aplinkos pH lygiams, buvo nustatyta, jog normaliomis sąlygomis, tiek didesnio rūgštingumo terpėje (kuri atitinka NPQ formavimosi sąlygas) abi būsenos egzistuoja kartu, tik pasikeičia šuolių tarp šių būsenų spartos, taigi ir LHCII komplekso persijungimo į tamsinę būseną dažnis. Tokiu būdu buvo patvirtinta, jog nepri-



**2 pav.** | Šviesinės (*on*) ir tamsinės (*off*) būsenų potencialiai paviršiai apibendrintųjų koordinatė  $X$  ir  $Y$  fazinėje erdvėje. Koordinatė  $X$  nusako greitus molekulinis svyravimų apie tam tikrą potencinės energijos minimumą, o apibendrintoji koordinatė  $Y$  aprašo lėtai vykstančius baltymo konformacinius pokyčius. Rodyklės vaizduoja įvairius šuolius tarp šių būsenų.

klausomai nuo aplinkos sąlygų, šviesą sugeriantys kompleksai gali būti tiek šviesinės būsenos, kuri dalyvauja pernešant sužadinimo energiją iš antenos į RC, tiek tamsinės, kai yra aktyvuojamas nefotocheminis sužadinimo gesinimas. Aplinkos poveikis pasireiškia kaip papildomas išorinis veiksnys, kuris moduliuoja LHCII kompleksų daugiamatį energijos paviršių ir tokiu būdu nukreipia dinaminę pusiausvyrą vienos iš egzistuojančių būsenų link. Tai pagrindžia disertacijos pirmąjį ginamąjį teiginį.

Kitoje antrojo skyriaus dalyje yra nagrinėjamas dar vienas savisaugos mechanizmas, kuris pasireiškia esant ryškesniam apšvietimui, – singuletinių ir tripletinių (ST) būsenų netiesinė anihiliacija. Matuojant sužadinimo gesimo kinetikas pavieniuose kompleksuose buvo nustatyta, jog jas galima dideliu tikslumu aprašyti dviejų eksponentinių funkcijų suma, kurių charakteringosios trukmės skiriasi dviem eilėmis (35 ps ir 3,5 ns), o santykinės amplitudės stipriai priklauso nuo žadinimo impulsų intensyvumo. Iš šių ir kitų papildomų matavimų galima buvo įtarti, jog stebimus rezultatus lemia singuletinių chlorofilo būsenų ir tripletinių karotenoido būsenų netiesinė anihiliacija, tačiau iki šiol egzistavęs šio proceso teorinis aprašymas negalėjo paaiškinti nei minėtų dvieksonenčių sužadinimo gesimo kinetikų, nei kitų stebėtų efektų [39]. Norint išspręsti šią dilemą, darbe pasiūlomas



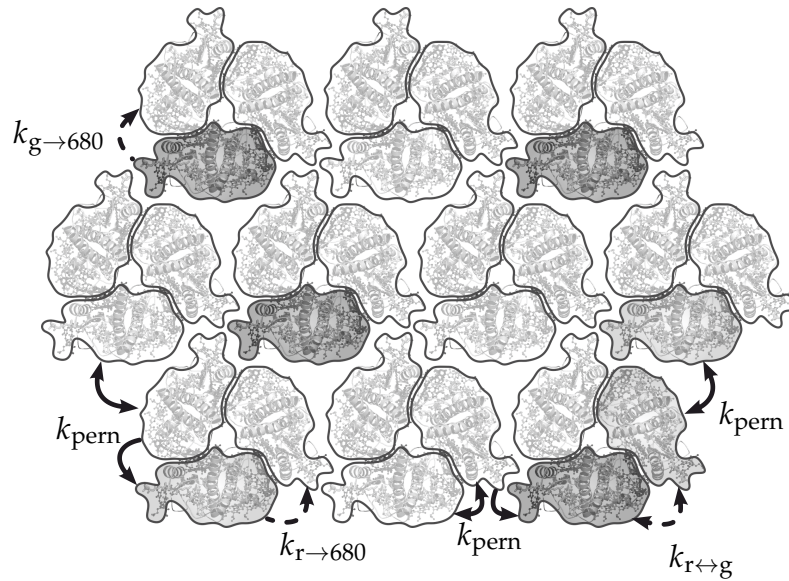
**3 pav.** | ST anihiliacijos stochastinis modelis. Pilki ovalai vaizduoja įvairias galimas sistemos būsenas, besiskiriančias esančių singuletų ir tripletų skaičiumi. Kiekvienos būsenos tikimybė yra  $P_{ij}$ , rodyklės vaizduoja galimus šuolius tarp šių būsenų:  $k$  ir  $K_T$  yra atitinkamai singuletinės ir tripletinės būsenos relaksacijos spartos,  $k_{ISC}$  žymi interkombinacinės konversijos spartą,  $\gamma$  yra ST anihiliacijos sparta, o  $G(t)$  yra išorinio žadinimo nulemta singuletų generacijos sparta.

ST anihiliaciją aprašantis statistikinis modelis, kuris atsižvelgia į tai, jog mažame pavieniame pigmentų ir baltymų komplekse gali susidaryti tik nedidelis diskretus singuletinių ar tripletinių sužadinių skaičius (žr. 3 pav.). Išsprendus atitinkamų diferencialinių lygčių sistemą, pavyko puikiai aprašyti tiek sužadimo gesimo kinetikas, tiek visų kitų atliktų eksperimentų rezultatus. Tai leido nustatyti tripletinės būsenos vidutinę gyvavimo trukmę ( $\tau_T = K_T^{-1} = 7 \mu\text{s}$ ), kuri atitinka karotenoidų charakteristikas. Paaiškėjo, jog minėtos dviekspontės fluorescencijos gesimo kinetikos priežastis yra atsitiktinis tripleto susidarymas ir jo relaksacija. Tokiu būdu čia vėl stebimos atsitiktinės vidinės fotosintetinio anteninio komplekso fliktuacijos tarp dviejų dominuojančių būsenų: greitoji kinetikos komponentė (35 ps) atsiranda dėl anihiliacijos tarp chlorofilo singuletinės būsenos ir sistemoje egzistuojančios vienos tripletinės karotenoido būsenos, tuo tarpu lėtoji kinetikos komponentė (3,5 ns) atitinka situaciją, kai tripletai visai nesusidarė, taigi singuletinis sužadimas gėsta dėl nuosavos disipacijos – fluorescencijos ar vidinės konversijos.

## Sužadavimo dinamika LHCII agregatuose

Siekiant išsiaiškinti, kaip aukščiau nustatyta LHCII kompleksų savybė „persijunginėti“ iš vienos būsenos į kitą gali lemti sužadavimo evoliuciją fotosintetinėje antenoje, trečiajame disertacijos skyriuje yra analizuojami neseniai išmatuoti nuo laiko ir temperatūros priklausantys LHCII trimerų bei jų agregatų fluorescencijos spektrai. Pirmoje šio skyriaus dalyje trumpai pristatomi šie eksperimentiniai rezultatai. Antroje dalyje pateikiama išsami gautų duomenų analizė, kuri leido nustatyti, jog LHCII agregate fotosintetiniai kompleksai gali būti trijų skirtingų būsenų: aukščiau aprašytos tamsinės, pasižyminčios greita sužadavimo relaksacija, ir bent dviejų šviesinių, spinduliuojančių skirtingose spektro srityse. Pasirodė, jog vienos iš jų, dažniausiai pasitaikančios, fluorescencijos spektras yra artimas atskiruose LHCII trimeruose stebimam spektrui, kurio intensyvumo pikas yra 680 nm srityje, o kitai, žymiai rečiau aptinkamai būsenai yra būdingas platesnis, ilgesnių bangos ilgių link pasislinkęs fluorescencijos spektras.

Atlikta eksperimentinių duomenų analizė leido nustatyti ne tik skirtingų šviečiančiųjų būsenų spektrines savybes, bet ir jų užpildos laikinę evoliuciją, kuriai aprašyti trečiajame skyriaus dalyje yra suformuluojamas stambiagrūdis sužadavimo energijos pernašos modelis, schematiškai pavaizduotas 4 pav. Iš disertacijos pirmajame skyriuje gautų rezultatų plaukia, jog vieno komplekso viduje energinė pusiausvyra tarp visų pigmentų nusistovi praėjus vos kelioms pikosekundėms nuo pradinio sužadavimo. Ši laiko skalė yra bent viena eile mažesnė negu iš skirtingų duomenų įvertinti energijos pernašos tarp atskirų gretimų kompleksų charakteringi laikai (apie 25 ps) [40, 41]. Todėl analizuojant kelių šimtų ps ar net kelių ns eilės fluorescencijos gesimo kinetikas į greitus kiekvieno komplekso viduje vykstančius procesus galima neatsižvelgti. Sumodeliavus sužadavimo migracijos per agregatą ir jo relaksacijos vyksmus buvo nustatyta, kaip nuo temperatūros priklauso tikimybė aptikti vienos ar kitos būsenos LHCII kompleksą. Pasirodė, jog tamsinėms ir raudonojoje spektro srityje fluorescuojančioms būsenoms šios tikimybės nuo temperatūros elgiasi skirtingai – tai leido nusakyti šių būsenų prigimtį. Buvo išsiaiškinta, jog „raudonai“ fluorescuojanti LHCII būsena atsiranda dėl eksitoninių ir chlorofilo–chlorofilo atskirtų krūvių būsenų susimaišymo, tuo tarpu už greitą sužadavimo gesimą atsakinga būsenos molekulinė prigimtis yra nekoherentinė sužadavimo pernaša iš chlorofilo į trumpai gyvuojančią karotenoido sužadintąją būseną. Pažymėtina, jog lygiai toks pat mechanizmas pirmajame disertacijos skyriuje padėjo suprasti dirbtiniuose LHCII kristaluose stebimą greitą fluorescencijos gesimą. Todėl natūralu manyti, jog abiem atvejais mes tu-



**4 pav.** | Stambiagrūdis sužadavimo pernašos modelis, taikytas sužadavimo dinamikai LHCII agregatuose aprašyti ir vaizduojantis manomą heksagoninį LHCII monomerų išsidėstymą agregate [42]. Priklausomai nuo baltymo konformacijos, kiekvienas LHCII monomeras gali būti vienos iš trijų galimų būsenų: dominuojančios, turinčios fluorescencijos spektro piką 680 nm srityje (pavaizduota baltu fonu); kitos spinduliuojančiosios būsenos, pasižyminčios fluorescencijos spektro raudonuoju poslinkiu (šviesiai pilkas fonas); arba tamsinės (NPQ) būsenos (tamsiai pilkas fonas). Pernašos spartos tarp įvairių monomerų pavaizduotos rodyklėmis ( $k_{\text{pern}}$  – pernašos sparta tarp vienos rūšies monomerų arba energijos mažėjimo kryptimi,  $k_{r(g) \rightarrow 680}$  – pernašos sparta iš „raudonojo“ komplekso (arba atitinkamai gesiklio) į dominuojančios būsenos monomera,  $k_{r \leftrightarrow g}$  – pernašos sparta tarp gretimų raudonai fluorescuojančio ir tamsinio kompleksų).

rime reikalą su tuo pačiu reiškiniu, taigi tas vidinis sužadavimo „gesiklis“ LHCII kompleksuose tikriausiai yra viena (ar abi) iš liuteino molekulių. Šis rezultatas pagrindžia antrąjį ginamąjį teiginį.

Šioje vietoje svarbu pažymėti, kad iš eksperimentinių duomenų nustatytos abiejų spinduliuojančiųjų būsenų populiacijos kinetikos rodo akivaizdžiai neeksponentinį elgesį. Norint atkartoti tokias priklausomybes, modeliuojant reikėjo atsižvelgti į dinaminis LHCII agregato pokyčius: kiekvienu laiko momentu kiekvienas atskirai paimtas kompleksas gali būti vienos iš trijų skirtingų būsenų. Tai gi siekiant tinkamai sumodeliuoti sužadavimo evoliuciją, apskaičiuotas kinetikas reikėjo suvidurkinti tiek per atsitiktinį įvairios būsenos kompleksų išsidėstymą agregate, tiek ir per kiekvienos būsenos aptiktų kompleksų skaičių. Būtent toks anteninių pigmentų ir baltymų kompleksų vidinių fliktuacijų įskaitymas ir leido atkartoti neeksponentines fluorescencijos gesimo kinetikas.

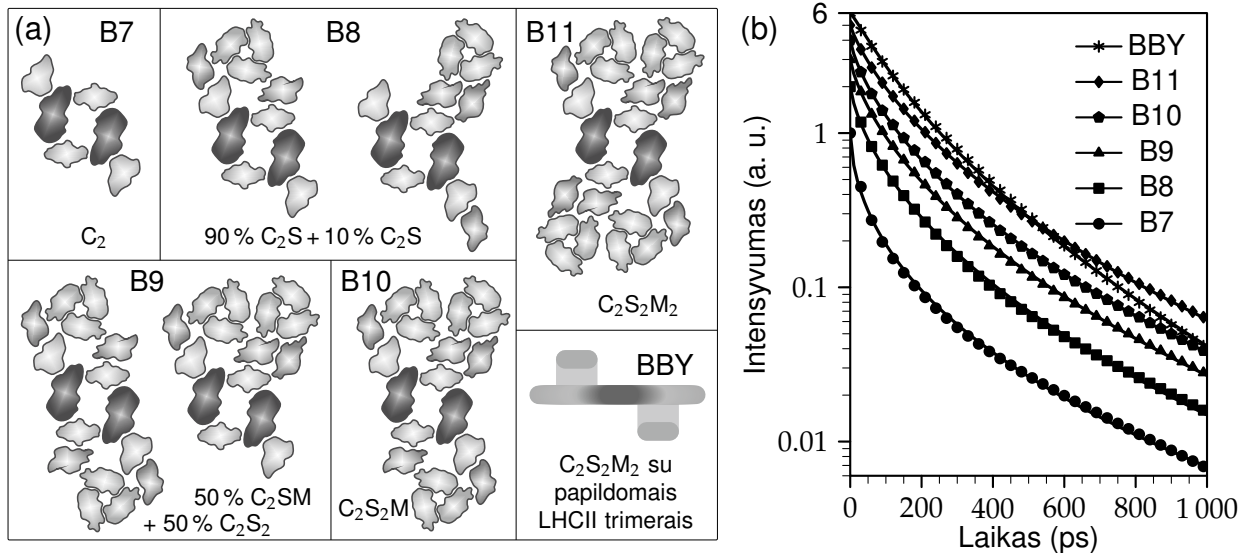


## Fotosintezė fliktuojančiojoje antenoje

Ketvirtajame disertacijos skyriuje toliau vystoma fliktuojančiosios antenos samprata, anksčiau įvesta antrame ir minėta trečiame skyriuose aptariant fluorescencijos gesimo kinetikų neeksponentiškumą. Šio skyriaus pirmoje dalyje trumpai aptariami neseniai atlikti fluorescencijos matavimų biochemiškai išskirtuose skirtingo dydžio FSII superkompleksuose rezultatai [43, 44]. Pasirodo, jog nepriklausomai nuo fotosistemos dydžio bei bandinio paruošimo būdo, visais atvejais stebimas akivaizdžiai daugiaeksponentis fluorescencijos gesimas (žr. 5 pav.), kuris ilgą laiką buvo siejamas su galima reakcijų centruose atskirtų krūvių rekombinacija bei sužadavimo grįžimu į anteną. Tačiau neseniai pasirodė darbų, parodančių, jog krūvio atskyrimas yra praktiškai negrįžtamas vyksmas [45], taip pat kitų eksperimentinių rezultatų, kurie buvo sunkiai interpretuojami naudojant įprastinius vaizdinius.

Siekiant išspręsti šią problemą, antrojoje skyriaus dalyje yra parodoma, jog minėto kinetikų neeksponentiškumo prigimtis gali slypėti ne reakcijų centruose, o juos supančioje antenoje. Iš tikrųjų, kaip buvo parodyta ankstesniuose skyriuose, dėl vidinės baltymo konformacinės dinamikos gali iš esmės pasikeisti paties komplekso savybės. Tačiau reikia atkreipti dėmesį ir į tai, jog pačių kompleksų tarpusavio išsidėstymas fotosistemoje nėra griežtai fiksuotas; laikui bėgant gali nežymiai keistis tiek baltyminių kompleksų orientacija, tiek atstumai tarp jų. Dėl šios priežasties keičiasi ir skirtingų sužadavimo pernašos reakcijų centro link kelių efektyvumas. Siekiant matematiškai aprašyti šiuos sudėtingus procesus, suformuluojamas paprastesnis modelis, nagrinėjantis sužadavimo difuziją tolydžioje terpėje. Tikrosios anteninės sistemos nevienalytiškumas, pernašos tarp kai kurių kompleksų nutrūkimas ir pan. efektai yra įskaitomi empiriškai, leidžiant minėtos tolydžios terpės dimensijai būti aprašomai bet koku (nebūtinai sveiku) skaičiumi  $d$ . Analiziškai išsprendus difuzijos lygtį, pademonstruojamas gautos sužadavimo kinetikos neeksponentinis gesimas.

Šis trupmenine dimensija aprašomojoje tolydinėje terpėje vykstančios sužadavimo difuzijos modelis trečioje skyriaus dalyje sėkmingai pritaikomas aukščiau minėtoms neeksponentinėms fluorescencijos gesimo kinetikoms skirtingo dydžio FSII superkompleksuose atkartoti (žr. 5b pav.). Pažymėtina, jog toks geras atitikimas tarp modeliavimo rezultatų ir eksperimentinių stebėjimų gautas naudojant tik du neapibrėžtus modelio parametrus – sistemos dimensiją  $d$  bei dar vieną parametą, siejantį sistemos dydį su vidutine sužadavimo pernašos tarp kompleksų sparta. Skyriaus gale šis modelis taip pat sėkmingai pritaikomas sužadavimui ki-

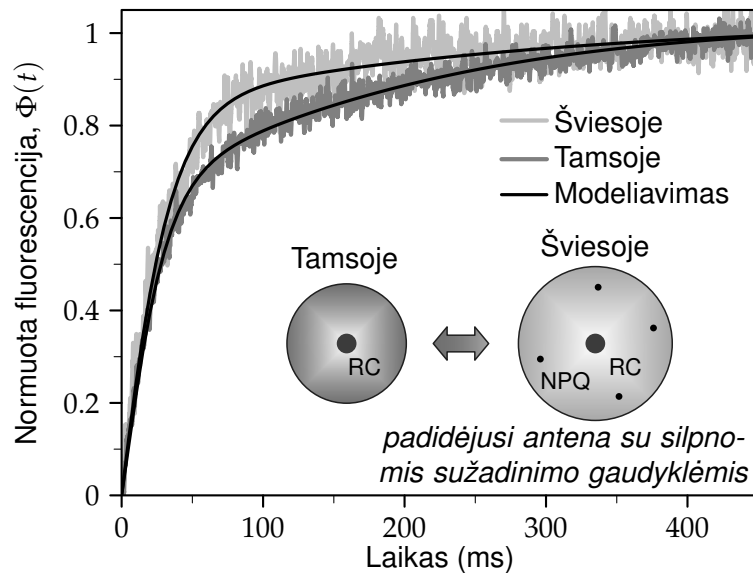


**5 pav.** | (a) Biochemiškai išskirtos skirtingo dydžio antrosios fotosistemos [43] bei jų anteninių pigmentų ir baltymų kompleksų struktūrinis išsidėstymas aplink FSII viduryje esančius reakcijų centrus (pažymėtus tamsiai pilka spalva). (b) Eksperimentinės (simboliai) ir sumodeliuotos (išsines linijos) fluorescencijos gesimo kinetikos šiuose FSII superkompleksuose.

tose sistemose – LHCII agregatuose bei tilakoidų membranoje – aprašyti; tokiu būdu pabrėžiamas jo bendras universalumas. Turint omenyje, kad jo pagalba galima nesunkiai paaiškinti ir kitus efektus, kurių negalėjo nusakyti anksčiau taikyti eksitonų ir reakcijų centrų radikalų porų pusiausvyrą postuluojuojantys modeliai, galima teigti, jog eksperimentuose stebimos fluorescencijos gesimo neeksponentiškumo prigimtis yra būtent fliktuojančiosios fotosintetinės antenos savybės, o ne reakcijų centrai, kas pagrindžia ketvirtąjį ginamąjį teiginį.

## Ekonominė fotoapsauga fotosintezės metu

Paskutiniame, penktajame, disertacijos skyriuje analizuojami makroskopiniai tilakoidų membranose vykstantys pokyčiai po trumpalaikio prisitaikymo prie sustiprėjusio apšvietimo. Skyriaus pirmoje dalyje pristatomi eksperimentiniai tyrimai, atlikti norint nustatyti, ar NPQ sąlygomis pasikeičia antrosios fotosistemos sugerties skerspjūvis. Ilgą laiką šis klausimas buvo „karštų“ diskusijų objektas, tačiau neseniai atlikti fluorescencijos indukcijos kinetikų matavimai mažo ir didelio apšvietimo sąlygomis pagaliau leido vienareikšmiškai į jį atsakyti. Minėtos kinetikos nusako stebimo fluorescencijos intensyvumo signalo sustiprėjimą dėl milisekundžių skalėje vykstančio reakcijų centrų užsidarymo. Atitinkamai, kinetikos augimo sparta gali suteikti informacijos apie FSII antenos dydį.



**6 pav.** | Normuotos fluorescencijos indukcijos kinetikos, išmatuotos mažo ir didelio apšvietimo sąlygomis, ir jas atitinkančios sumodeliuotos kreivės, apskaičiuotos pritaikant stochastinį heterogeniškos fotosintetinės membranos modelį. Po grafiku pateiktas apibendrintas modeliavimo rezultatas: augalui adaptuojantis prie ryškesnio apšvietimo, FSII šviesos surinkimo antenoje ne tik atsiranda daugiau už nefotocheminį sužadavimo gesimą atsakingų centrų, bet kartu tilakoidų membranose įvyksta makroskopiniai pokyčiai, nulemiantys RC supančios antenos padidėjimą.

Antroje skyriaus dalyje pateikiami keli teoriniai modeliai, skirti minėtoms kinetikoms aprašyti. Vėliau jie pritaikomi analizuojant fluorescencijos indukcijos kreives, išmatuotas naudojant iš įvairių genetiškai modifikuotų augalų išskirtas fotosintetines membranas, turinčias skirtingą, iš biocheminės analizės žinomą, anteninių baltyminių kompleksų skaičių. Tai leido įvertinti įvairių modelių tinkamumą tilakoiduose vykstantiems procesams aprašyti. Paaiškėjo, jog tilakoidų membranos pasižymi didelio laipsnio nevienalytiškumu, o energijos pernaša tarp įvairių membranoje esančių fotosistemų yra labai ribota. Šią išvadą taip pat patvirtina elektroninės mikroskopijos būdu padarytos tilakoidų membranos nuotraukos.

Nustačius labiausiai tinkamą teorinį aprašymą, jis buvo pritaikytas analizuojant minėtas fluorescencijos intensyvumo augimo kinetikas, išmatuotas atitinkamai prie mažo ir didelio šviesos intensyvumo prisitaikiusiuose chloroplastuose. Rezultatas yra pateikiamas 6 pav. Iš modeliavimo galima daryti išvadas, jog, priešingai negu buvo postuluojuama anksčiau, NPQ sąlygomis reakcijų centrų supančios antenos dydis išauga prie jos prisijungus papildomiems LHCII trimereams, o patys už NPQ atsakingi centrai yra pakankamai silpni ir sužadavimo gesi-

mo požiūriu beveik nekonkuruoja su atvirais reakcijų centrais. Toks „ekonominės fotoapsaugos“ mechanizmas leidžia augalui gauti dvigubos naudos: pirma, atsižvelgiant į praeituose skyriuose nustatytą NPQ prigimtį kaip vieną iš galimų LHCI būsenu, galima teigti, jog ryškioje šviesoje padidėjusi antena reiškia didesnę tikimybę, kad kuris nors pigmentų ir baltymų kompleksų pereis į sužadini- mo „gesiklio“ būseną. Kita vertus, jeigu krintančios šviesos intensyvumas staiga vėl sumažėja, didesnė antena gali kompensuoti dėl NPQ susilpnėjusį sužadinimų srautą atvirų reakcijų centrų link. Tokiu būdu lėtosios NPQ gaudyklės, atsitiktinai galinčios atsirasti bet kurioje antenos vietoje, suteikia augalui lankstumo laipsniškai reguliuojant nefotocheminio gesimo efektyvumą bei nepadarrant žalos fo- tosintezės produktyvumui. Ši išvada pagrindžia trečiąjį ginamąjį teiginį.

## Literatūra

- [1] R. E. Blankenship, D. M. Tiede, J. Barber, *et al.*, "Comparing photosynthetic and photovoltaic efficiencies and recognizing the potential for improvement," *Science*, 2011, **332**, 805–809.
- [2] R. E. Blankenship, *Molecular Mechanisms of Photosynthesis*. Chichester: Wiley Blackwell, 2nd ed., 2014.
- [3] R. Croce and H. van Amerongen, "Light-harvesting and structural organization of photosystem II: from individual complexes to thylakoid membrane," *J. Photochem. Photobiol. B*, 2011, **104**, 142–153.
- [4] G. D. Scholes, G. R. Fleming, A. Olaya-Castro, and R. van Grondelle, "Lessons from nature about solar light harvesting," *Nat. Chem.*, 2011, **3**, 763–774.
- [5] R. Croce and H. van Amerongen, "Light-harvesting in photosystem I," *Photosynth. Res.*, 2013, **116**, 153–166.
- [6] H. van Amerongen and R. Croce, "Light harvesting in photosystem II," *Photosynth. Res.*, 2013, **116**, 251–263.
- [7] C. D. P. Duffy, L. Valkunas, and A. V. Ruban, "Light-harvesting processes in the dynamic photosynthetic antenna," *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2013, **15**, 18752–18770.
- [8] R. Croce and H. van Amerongen, "Natural strategies for photosynthetic light harvesting," *Nat. Chem. Biol.*, 2014, **10**, 492–501.
- [9] A. Ruban, *The Photosynthetic Membrane: Molecular Mechanisms and Biophysics of Light Harvesting*. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd, 2013.
- [10] A. V. Ruban, M. P. Johnson, and C. D. P. Duffy, "The photoprotective molecular switch in the photosystem II antenna," *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.*, 2012, **1817**, 167–181.
- [11] A. O. Goushcha, V. N. Kharkyanen, G. W. Scott, and A. R. Holzwarth, "Self-regulation phenomena in bacterial reaction centers. I. General theory," *Biophys. J.*, 2000, **79**, 1237–1252.

- [12] A. O. Goushcha, A. J. Manzo, G. W. Scott, *et al.*, "Self-regulation phenomena applied to bacterial reaction centers: 2. Nonequilibrium adiabatic potential: Dark and light conformations revisited," *Biophys. J.*, 2003, **84**, 1146–1160.
- [13] N. E. Holt, D. Zigmantas, L. Valkunas, X. P. Li, K. K. Niyogi, and G. R. Fleming, "Carotenoid cation formation and the regulation of photosynthetic light harvesting," *Science*, 2005, **307**, 433–436.
- [14] A. A. Pascal, Z. F. Liu, K. Broess, *et al.*, "Molecular basis of photoprotection and control of photosynthetic light-harvesting," *Nature*, 2005, **436**, 134–137.
- [15] A. V. Ruban, R. Berera, C. Iliaia, *et al.*, "Identification of a mechanism of photoprotective energy dissipation in higher plants," *Nature*, 2007, **450**, 575–578.
- [16] T. K. Ahn, T. J. Avenson, M. Ballottari, Y. C. Cheng, K. K. Niyogi, R. Bassi, and G. R. Fleming, "Architecture of a charge-transfer state regulating light harvesting in a plant antenna protein," *Science*, 2008, **320**, 794–797.
- [17] M. G. Müller, P. Lambrev, M. Reus, E. Wientjes, R. Croce, and A. R. Holzwarth, "Singlet energy dissipation in the photosystem II light-harvesting complex does not involve energy transfer to carotenoids," *ChemPhysChem*, 2010, **11**, 1289–1296.
- [18] X.-G. Zhu, S. P. Long, and D. R. Ort, "Improving photosynthetic efficiency for greater yield," *Annu. Rev. Plant Biol.*, 2010, **61**, 235–261.
- [19] D. Gust and T. A. Moore, "Mimicking photosynthesis," *Science*, 1989, **244**, 35–41.
- [20] P. A. Liddell, D. Kuciauskas, J. P. Sumida, *et al.*, "Photoinduced charge separation and charge recombination to a triplet state in a carotene–porphyrin–fullerene triad," *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, **119**, 1400–1405.
- [21] D. Gust, T. A. Moore, and A. L. Moore, "Realizing artificial photosynthesis," *Faraday Discuss.*, 2012, **155**, 9–26.
- [22] I. Carmeli, I. Lieberman, L. Kravarsky, Z. Fan, A. O. Govorov, G. Markovich, and S. Richter, "Broad band enhancement of light absorption in photosystem I by metal nanoparticle antennas," *Nano Lett.*, 2010, **10**, 2069–2074.
- [23] K. J. Young, L. A. Martini, R. L. Milot, *et al.*, "Light-driven water oxidation for solar fuels," *Coord. Chem. Rev.*, 2012, **256**, 2503–2520.
- [24] Y. Zhao, J. R. Swierk, J. D. Megiatto, Jr, *et al.*, "Improving the efficiency of

- water splitting in dye-sensitized solar cells by using a biomimetic electron transfer mediator," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2012, **109**, 15612–15616.
- [25] C. Liu, J. Tang, H. M. Chen, B. Liu, and P. Yang, "A fully integrated nanosystem of semiconductor nanowires for direct solar water splitting," *Nano Lett.*, 2013, **13**, 2989–2992.
- [26] S. Y. Reece, J. A. Hamel, K. Sung, T. D. Jarvi, A. J. Esswein, J. J. H. Pijpers, and D. G. Nocera, "Wireless solar water splitting using silicon-based semiconductors and earth-abundant catalysts," *Science*, 2011, **334**, 645–648.
- [27] D. G. Nocera, "The artificial leaf," *Acc. Chem. Res.*, 2012, **45**, 767–776.
- [28] A. Azarpira, M. Lublow, A. Steigert, *et al.*, "Efficient and stable TiO<sub>2</sub>:Pt–Cu(In,Ga)Se<sub>2</sub> composite photoelectrodes for visible light driven hydrogen evolution," *Adv. Energy Mater.*, 2015, 1402148.
- [29] C. Liu, J. J. Gallagher, K. K. Sakimoto, E. M. Nichols, C. J. Chang, M. C. Y. Chang, and P. Yang, "Nanowire-bacteria hybrids for unassisted solar carbon dioxide fixation to value-added chemicals," *Nano Lett.*, 2015, **15**, 3634–3639.
- [30] H. van Amerongen, L. Valkunas, and R. van Grondelle, *Photosynthetic Excitons*. Singapore: World Scientific, 2000.
- [31] Z. F. Liu, H. C. Yan, K. B. Wang, *et al.*, "Crystal structure of spinach major light-harvesting complex at 2.72 Å resolution," *Nature*, 2004, **428**, 287–292.
- [32] T. Förster, "Zwischenmolekulare energiewanderung und fluoreszenz," *Ann. Phys.*, 1948, **437**, 55–75.
- [33] T. Förster, "10th spiels memorial lecture. transfer mechanisms of electronic excitation," *Discuss. Faraday Soc.*, 1959, **27**, 7–17.
- [34] M. Şener, J. Strümpfer, J. Hsin, D. Chandler, S. Scheuring, C. N. Hunter, and K. Schulten, "Förster energy transfer theory as reflected in the structures of photosynthetic light-harvesting systems," *ChemPhysChem*, 2011, **12**, 518–531.
- [35] T. P. J. Krüger, C. Iliaia, and R. van Grondelle, "Fluorescence intermittency from the main plant light-harvesting complex: Resolving shifts between intensity levels," *J. Phys. Chem. B*, 2011, **115**, 5071–5082.
- [36] T. P. J. Krüger, C. Iliaia, L. Valkunas, and R. van Grondelle, "Fluorescence intermittency from the main plant light-harvesting complex: Sensitivity to the local environment," *J. Phys. Chem. B*, 2011, **115**, 5083–5095.
- [37] T. P. J. Krüger, V. I. Novoderezhkin, C. Iliaia, and R. van Grondelle, "Flu-

- orescence spectral dynamics of single LHCII trimers," *Biophys. J.*, 2010, **98**, 3093–3101.
- [38] F. D. Stefani, J. P. Hoogenboom, and E. Barkai, "Beyond quantum jumps: Blinking nanoscale light emitters," *Physics Today*, 2009, **62**, 34–39.
- [39] Y. Zaushitsyn, K. G. Jespersen, L. Valkunas, V. Sundström, and A. Yartsev, "Ultrafast dynamics of singlet-singlet and singlet-triplet exciton annihilation in poly(3-2'-methoxy-5'octylphenyl)thiophene films," *Phys. Rev. B*, 2007, **75**, 195201.
- [40] V. Barzda, V. Gulbinas, R. Kananavicius, V. Cervinskas, H. van Amerongen, R. van Grondelle, and L. Valkunas, "Singlet-singlet annihilation kinetics in aggregates and trimers of LHCII," *Biophys. J.*, 2001, **80**, 2409–2421.
- [41] D. I. G. Bennett, K. Amarnath, and G. R. Fleming, "A structure-based model of energy transfer reveals the principles of light harvesting in photosystem II supercomplexes," *J. Am. Chem. Soc.*, 2013, **135**, 9164–9173.
- [42] J. P. Dekker and E. J. Boekema, "Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants," *Biochim. Biophys. Acta, Bioenerg.*, 2005, **1706**, 12–39.
- [43] S. Caffarri, R. Kouril, S. Kereiche, E. J. Boekema, and R. Croce, "Functional architecture of higher plant photosystem II supercomplexes," *EMBO J.*, 2009, **28**, 3052–3063.
- [44] S. Caffarri, K. Broess, R. Croce, and H. van Amerongen, "Excitation energy transfer and trapping in higher plant photosystem II complexes with different antenna sizes," *Biophys. J.*, 2011, **100**, 2094–2103.
- [45] C. D. van der Weij-de Wit, J. P. Dekker, R. van Grondelle, and I. H. M. van Stokkum, "Charge separation is virtually irreversible in photosystem II core complexes with oxidized primary quinone acceptor," *J. Phys. Chem. A*, 2011, **115**, 3947–3956.



---

## Autoriaus mokslinių publikacijų disertacijos tema sąrašas

1. J. Chmeliov, A. Gelzinis, E. Songaila, R. Augulis, C. D. P. Duffy, A. V. Ruban, L. Valkunas, "The Nature of Self-Regulation in Photosynthetic Light-Harvesting Antenna", under review in *Nature*.
2. J. M. Gruber, J. Chmeliov, T. P. J. Krüger, L. Valkunas, R. van Grondelle, "Singlet-Triplet Annihilation in Single LHCII Complexes," *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2015, **17**, 19844–19853.
3. J. Chmeliov, W. P. Bricker, C. Lo, E. Jouin, L. Valkunas, A. V. Ruban, C. D. P. Duffy, "An 'All Pigment' Model of Excitation Quenching in LHCII," *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2015, **17**, 15857–15867.
4. J. Chmeliov, G. Trinkunas, H. van Amerongen, L. Valkunas, "Excitation Migration in Fluctuating Light-Harvesting Antenna Systems," *Photosynthesis Research*, 2015, doi:10.1007/s11120-015-0083-3.
5. E. Belgio, E. Kapitonova, J. Chmeliov, C. D. P. Duffy, P. Ungerer, L. Valkunas, A. V. Ruban, "Economic Photoprotection in Photosystem II That Retains a Complete Light Harvesting System with Slow Energy Traps," *Nature Communications*, 2014, **5**, 4433.
6. J. Chmeliov, G. Trinkunas, H. van Amerongen, L. Valkunas, "Light Harvesting in a Fluctuating Antenna," *Journal of the American Chemical Society*, 2014, **136**, 8963–8972.
7. J. Chmeliov, L. Valkunas, T. P. J. Krüger, C. Iliaia, R. van Grondelle, "Fluorescence Blinking of Single Major Light-Harvesting Complexes," *New Journal of Physics*, 2013, **15**, 085007.
8. C. D. P. Duffy, J. Chmeliov, M. Macernis, J. Sulskus, L. Valkunas, A. V. Ruban, "Modeling of Fluorescence Quenching by Lutein in the Plant Light-Harvesting Complex LHCII," *The Journal of Physical Chemistry B*, 2013, **117**, 10974–10986.
9. L. Valkunas, J. Chmeliov, T. P. J. Krüger, C. Iliaia, R. van Grondelle, "How Photosynthetic Proteins Switch," *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 2012, **3**, 2779–2784.

---

## Autoriaus skaitytų pranešimų mokslinėse konferencijose sąrašas

1. J. Chmeliov, L. Valkūnas, J. M. Gruber, T. P. J. Kruger, R. van Grondelle, "Pavieniai fotosintetiniai anteniniai kompleksai ir jų fluorescencijos ypatumai", *41-oji Lietuvos Nacionalinė Fizikos konferencija*, Vilnius, Lithuania, June 17–19, 2015.
2. J. Chmeliov, M. Gruber, R. van Grondelle, L. Valkunas, "Singlet–Triplet Annihilation in Single Light-Harvesting Complexes," *Light-harvesting processes: an interdisciplinary conference on novel concepts of light-harvesting phenomena and related topics*, Banz Monastery, Germany, March 8–12, 2015.
3. J. Chmeliov, G. Trinkunas, H. van Amerongen, L. Valkunas, "Light Harvesting in a Fluctuating Antenna," *Workshop on Ultrafast Processes in Photosynthesis. New Vistas at ELI-ALPS*, Szeged, Hungary, October 18–21, 2014.
4. J. Chmeliov, G. Trinkunas L. Valkunas, "Fluctuating Antenna as an Origin of Multi-Exponential Fluorescence Kinetics in Photosystem II," *11th Nordic Femtochemistry Conference*, Vilnius, Lithuania, May 26–27, 2014.
5. J. Chmeliov, "Regulation and Adaptation Processes in Photosynthetic Light-Harvesting Complexes," *International Conference "Biophysics of Photosynthesis"*, Rome, Italy, October 28–30, 2013.
6. J. Chmeliov, L. Valkunas, C. D. P. Duffy, E. Belgio, A. V. Ruban, "Augalų antrosios fotosistemos molekuliniai apsaugos mechanizmai," *40-oji Lietuvos Nacionalinė Fizikos konferencija*, Vilnius, Lithuania, June 10–12, 2013.
7. J. Chmeliov, L. Valkunas, G. Trinkunas, "Excitation Energy Transfer and Regulation in Photosynthetic Light-Harvesting Complexes," *Light-harvesting processes: an interdisciplinary conference on novel concepts of light-harvesting phenomena and related topics*, Banz Monastery, Germany, April 7–11, 2013.
8. J. Chmeliov, L. Valkunas, "Excitation Energy Quenching in Photosynthetic Light-Harvesting Antenna," *Vilnius Workshop on Non-Linear Spectroscopy and Open Quantum Systems*, Vilnius, Lithuania, October 22–23, 2012.
9. J. Chmeliov, L. Valkunas, G. Trinkunas, T. P. J. Krüger, R. van Grondelle, "Excitation Energy Transfer and Regulation in Photosynthetic Light-Harvesting Antenna," *10th International Conference on Excitonic Processes in Condensed*

*Matter, Nanostructured and Molecular Materials*, Groningen, The Netherlands, July 2–6, 2012.

10. J. Chmeliov, L. Valkunas, “Pavienių fotosintetinių anteninių kompleksų trūkinėjančioji fluorescencija,” *Fizinių ir technologijos mokslų tarpdalykiniai tyrimai: 2-oji LMA Jaunųjų mokslininkų konferencija*, Vilnius, Lithuania, February 14, 2012.
11. J. Chmeliov, L. Valkunas, G. Trinkunas, “Excitation Energy Transfer and Fluorescence Quenching in Photosynthetic Light-Harvesting Antenna,” *Vilnius Workshop on Non-Linear Spectroscopy and Open Quantum Systems*, Vilnius, Lithuania, November 7–10, 2011.
12. J. Chmeliov, L. Valkūnas, T. P. J. Krüger, C. Ilioaia, R. van Grondelle, “Pavienių fotosintetinių anteninių kompleksų trūkinėjančioji fluorescencija,” *39-oji Lietuvos Nacionalinė Fizikos konferencija*, Vilnius, Lithuania, October 6–8, 2011.

---

## Apie autorių

Jevgenij Chmeliov gimė 1986 m. Vilniuje. 2005 m. baigė Vilniaus „Ateities“ vidurinę mokyklą bei su auksiniu diplomu trejų metų studijas papildomo ugdymo mokykloje „Fizikos Olimpas“, kur įgytos fizikos žinios padėjo jam laimėti bronzos medalį 2005 m. vykusioje Tarptautinėje fizikos moksleivių olimpiadoje. Tais pačiais metais įstojo į Vilniaus universiteto Fizikos fakulteto kompiuterinės fizikos studijų programą, kurią sėkmingai (su *Cum Laude* diplomu) baigė 2009 m. 2011 m. su *Magna Cum Laude* diplomu baigė Vilniaus universiteto Fizikos fakulteto teorinės fizikos ir astrofizikos magistrantūros studijų programą. Tais pačiais metais buvo priimtas į doktorantūrą Vilniaus universitete. Yra paskelbęs 14 publikacijų moksliniuose žurnaluose bei yra dviejų straipsnių bendraautorius Lietuvos mokslo populiarinimo žurnaluose. Dominančios tyrimų kryptys: sužadavimo energijos pernašos ir nefotocheminio gesimo reiškiniai fotosintezės metu, netiesinė eksitonų dinamika anglies nanovamzdeliuose ir kituose nanodariniuose.

---

## Summary

# Excitation evolution and self-regulation in photosynthetic light-harvesting systems

In this dissertation, we studied various aspects of excitation dynamics and relaxation in photosynthetic light-harvesting systems, at every step making an attempt to approach a better understanding of one of the today's most puzzling photoprotective mechanisms implemented by Nature in living organism—the non-photochemical quenching (NPQ). This term combines a whole set of various processes occurring in the thylakoid membranes of green plants and algae during the short-term acclimation to the increased solar radiation. Over the last two decades, the main concepts of the photosynthetic light harvesting and self-regulation have been formulated, providing a strong foundation for the latter studies implementing modern spectroscopic techniques and taking advantages of the cooperation of many people from different fields working together to solve the mystery of NPQ. The author of this dissertation unpretentiously believes that the study covered herein have also made its small contribution towards our deeper understanding of the molecular origin of the self-regulatory processes in photosynthesis.

The dissertation begins from the structure-based calculations of the exciton evolution in the LHCII complex. Particularly, by accounting for the quantum-chemistry calculations of the dipole-forbidden  $S_1$  state of carotenoids, we identified lutein molecules as the most efficient excitation quencher in the LHCII crystals. Then, based on the fluorescence measurements in single light-harvesting complexes, we provided strong evidences that NPQ state in LHCII is not formed under some particular environment conditions but is rather one of the intrinsic states of the pigment–protein that randomly becomes available as a result of the protein's subtle conformational dynamics. Exposure to any ambient stress, like variations of the detergent concentration, pH level, temperature, *etc.*, in fact does not produce new states itself but just modulates the energy landscape of the pigment–protein complex thus shifting the dynamic equilibrium towards one or another state. Consequently, the probability of that particular state increases leading to the observed variations in fluorescence spectrum and/or intensity.

Our thorough analysis of the temperature-dependent time-resolved fluorescence spectra of LHCII trimers and aggregates allowed us to independently identify at least three distinct functional states of these pigment–protein complexes that were previously observed by means of single-molecule spectroscopy. Namely, besides the dominating state corresponding to strong fluorescence around the

680-nm spectral region, the state responsible for the fluorescence signal at longer wavelengths as well as the quenched states were revealed. Calculations of excitation energy dynamics in the LHCII aggregate allowed us to associate each state with a specific underlying molecular mechanism. In particular, we showed that the red-emitting state arises due to partial mixing of excitonic and chlorophyll–chlorophyll charge transfer states. On the other hand, the nature of the quenched state was demonstrated to be totally different and related to the incoherent excitation transfer to the short-lived carotenoid excited states. According to our previous structure-based calculations on LHCII crystals, lutein molecule is the most probable candidate for this role.

Turning back to the NPQ phenomenon, we showed that all our conclusions based on the analysis of the artificially made LHCII crystals or aggregates can be in a straightforward way generalized to the processes occurring *in vivo*. We demonstrated that in a relatively small light-harvesting antenna of PSII, even slight variation of the concentration of the quenched complexes can significantly reduce fluorescence quantum yield. The physical increase of the PSII absorption cross-section, revealed from the fluorescence induction kinetics, ensures even better photoprotection due to higher probability for the generation of NPQ centers within the antenna and, at the same time, minimizes the drop in excitation delivery to the open reaction centers. This effect gives us a perfect example of the economic design principles of the natural photosynthesis that might be learned and implemented in the mankind's attempts to build up artificial photosynthetic devices.

Finally, we have demonstrated that the multi-exponential fluorescence decay kinetics, observed in various antenna systems—from the single LHCII trimers to their aggregates, variously sized photosystems, or even thylakoid membranes—is just a manifestation of the fluctuating properties of the light-harvesting antenna and its proteins. We believe that this conclusion, breaking the long-existed dogma of the important role of the radical pair equilibration at the side of the excitation quencher and presenting a simple alternative explanation to the known facts, will inspire more detailed future studies, further broadening the current understanding of light-harvesting processes in photosynthesis.

**About the author:** Jevgenij Chmeliiov was born in 1986 in Vilnius, Lithuania. He received his Bachelor degree in Physics at Vilnius University in 2009. In 2011 he received his Master degree in Physics, also at Vilnius university. The current research interests cover excitation energy dynamics in molecular systems and non-photochemical quenching in photosynthesis.