

VILNIAUS UNIVERSITETAS
FIZIKOS FAKULTETAS
TEORINĖS FIZIKOS KATEDRA

Tomas Babelis

ŠVIOSOS SURINKIMO ANTENŲ KAITOS TILAKOIDUOSE ATPAŽINIMAS

Magistrantūros studijų baigiamasis darbas

Teorinės fizikos ir astrofizikos
studijų programa

Studentas

Tomas Babelis

Darbo vadovas

dr. Gediminas Trinkūnas

Recenzentas

dr. Jevgenij Chmeliov

Katedros vedėjas

prof. habil. dr. Leonas Valkūnas

Vilnius 2016

Turinys

Įvadas	1
1 Fliktuojančių antenų modelis	5
2 Antroji fotosistema	8
2.1 Antrosios fotosistemos sandara	8
2.2 Fliktuojančių antenų modelio taikymas antros fotosistemos struktūros nustatymui	9
3 Pirmoji fotosistema	13
3.1 Pirmosios fotosistemos sandara	13
3.2 Fliktuojančių antenų modelio taikymas pirmos fotosistemos struktūros nusta- tymui	14
3.3 Pirma fotosistema, prisijungusi antros fotosistemos kompleksus	17
4 Tilakoidai	19
4.1 Fliktuojančių antenų modelio taikymas tilakoido struktūros nustatymui	19
4.2 Tilakoidų struktūros prie skirtingų apšvitų	20
4.3 Pirma ir antra tilakoido būsenos	22
4.4 Mutantai tilakoiduose	24
5 Dirbtinių neuroninių tinklų panaudojimas, sprendžiant nevienareikšmiškumo problemą fliktuojančių antenų modelio parametrų paieškos uždavinyje	26
Išvados	28
Literatūros sąrašas	30
Santrauka	35
Priedas Nr. 1.	36

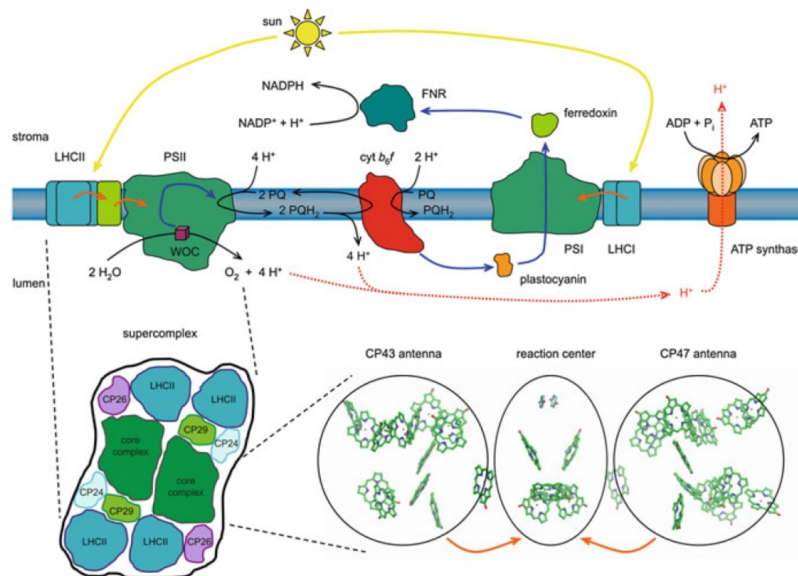
Įvadas

Saulės šviesos energija svariai prisidėjo prie gyvybės bei biosferos formavimosi [1]. Visos gyvybės formos yra autonominės sistemos, sudarytos iš polimerų, baltymų, anglies hidratų, lipidų ir nukleino rūgščių. Tam, kad jos galėtų išlaikyti vientisumą, augti, vystytis, prisitaikyti prie aplinkos bei daugintis, joms yra būtina pasiimti energiją iš aplinkos [2]. Taigi, beribis saulės energijos kiekis yra tiesiog būtina sąlyga gyvybės egzistavimui. Tiesiogiai šviesos energiją naudojantys organizmai per daugelį metų išvystė įvairias funkcijas, leidžiančias reguliuoti šviesos energijos patekimą į jų sistemas bei efektyvų šios energijos panaudojimą, reikalingą išgyvenimui bei dauginimuisi.

Šviesos sugertis pradeda šviesos energijos transformacijos seką, kuri sudaro fotosintezę: procesą, kurio metu šviesos energija konvertuojama į cheminę energiją organinių junginių pavidalu. Deguoninė fotosintezė yra populiariausias šviesos energijos konvertavimo procesas žemės biosferoje. Deguoninė fotosintezė transformuoja fotonų energiją į gliukozę paimdama anglį iš CO_2 molekulės ir panaudodama elektroną, gautą iš vandens molekulėje esančio deguonies. Ši fotosintezė išskiria deguonį, kaip reakcijos šalutinį produktą. Nors tai yra labai paprasta cheminė reakcija, organizmai išvystė labai sudėtingus energijos konvertavimo etapus tam, kad ši reakcija būtų įmanoma [2]. Molekulinė struktūra, apimanti šiuos energijos konvertavimo etapus, yra lokalizuota chloroplastuose esančiuose tilakoiduose (1 pav.). Ji susideda iš daugybės baltymų, sudarančių makromolekulinę pirmos ir antros fotosistemos struktūrą (FSI ir FSII).

Tam, kad fotosintezės reakcijos centras dirbtų efektyviai, augalai naudoja šviesą sugeriančių antenų kompleksus, sudarytus iš daugybės pigmentų, kurie sugeria šviesą ir perduoda surinktą energiją reakcijos centrui (RC). Tuomet reakcijos centre įvyksta krūvio atskyrimas, po kurio prasideda cheminių reakcijų seka, pasibaigianti ATP ir NADPH sinteze. Fotosistemų kvantinis našumas priklauso nuo antenų dydžio bei sistemoje esančių laikinų sužadavimo lokalizacijos mazgų, dėl kurių sužadinimas gali relaksuoti taip ir nepasiekęs RC. Priklausomai nuo to, kokios yra aplinkos sąlygos, šie parametrai kinta taip, kad būtų maksimalus fotosistemos našumas bei minimali žala fotosistemai (esant per didelei apšvitai) [4]. Priklausomai nuo aplinkos poveikio trukmės, fotosistemų struktūros pokyčiai klasifikuojami į ilgalaikius (ilgalaikis prisitaikymas) ir trumpalaikius (trumpalaikis prisitaikymas).

Ilgalaikis sistemos prisitaikymas yra susijęs su LHCII kompleksų sinteze tilakoide [5]. Trumpalaikio prisitaikymo metu dalis LHCII kompleksų migruoja tarp FSII ir FSI. Šis procesas yra vadinamas būsenos pasikeitimu (angl. *state transition*) [6]. Pirmojoje būsenoje visi LHCII kompleksai sudaro tik FSII išorinę anteną. Tuo tarpu antrojoje būsenoje dalis LHCII kompleksų difunduoja prie FSI branduolio (2 pav.). Kuri dalis LHCII trimerų dalyvauja būsenos pasikeitime, išlieka atviras klausimas. Pasak vienu šaltinių, pereinant į antrą būseną, tik nedidelė dalis LHCII difunduoja prie FSI [7, 8], pasak kitų šaltinių, ši dalis gali sudaryti net 80% LHCII kompleksų [9].

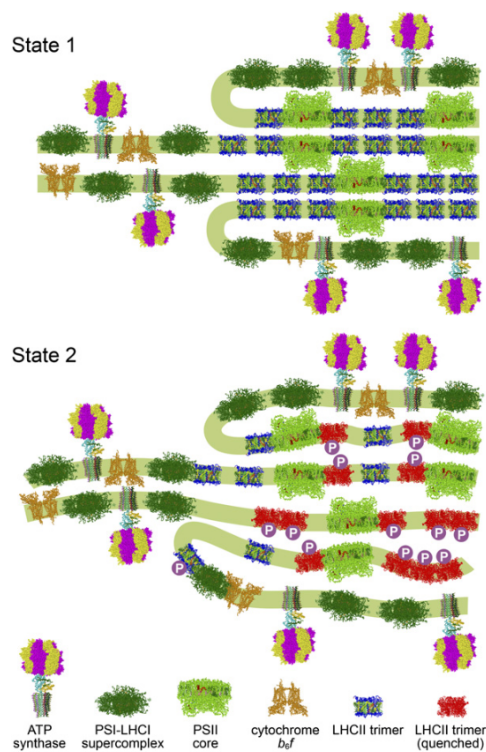


1 pav. Fotosintezės mechanizmas augale esančiame tilakoide. FSI ir FSII fotonų sugertį vykdo vienu metu. Kai pirmoje fotosistemoje sužadinimas pasiekia reakcijos centrą, jis išskaido vandens molekulę į deguonį (kaip šalutinį produktą) ir vandenilį. Tuomet sužadintą elektroną pagavusi chinono molekulė ištrūksta iš FSII ir nukeliauja prie b_6f kompleksu, kuriame ir atiduoda sužadintą elektroną. Kompleksas b_6f veikia kaip protonų pompa ir į jį patekus elektronui jis įsiurbia protoną į tilakoido vidų. Įsiurbti protonai bei protonai, gauti skaldant vandens molekulę, sudaro ATP statybines medžiagas. Tuo tarpu sužadintą elektroną prisijungia plastocianinas. Galiausiai elektronas iš plastocianino patenka į FSI, kurioje užima laisvą vietą, atsiradusią po to, kai šviesos sužadintas elektronas paliko FSI. Elektronui patekus į FSI reakcijos centrą šį elektroną pasigauna feridoksinas, esantis tilakoido išorėje, ir panaudoja NADPH sintezei. Paveikslėlis iš [3] šaltinio.

Šviesą sugeriančios antenos energijos perdavimo mechanizmas nėra iki galo suprastas. Vienas iš būdų paaiškinti energijos perdavimo mechanizmą antenoje remiasi struktūrine tinkama biologinėje sistemoje. FSII-oje esantys išoriniai antenų kompleksai tarpusavyje nuolat juda ir, keičiantis atstumui tarp atskirų kompleksų, keičiasi keliai, kuriais gali keliauti sužadinimas link RC. Tuo remiasi fluktuojančių antenų (FA) modelis, energijos perdavimo sistemą aprašantis tik dviem parametrais [10]. Šis modelis taip pat puikus tuo, kad šie parametrai suteikia informacijos apie sistemos struktūrą: vienas parodo sistemos dydį, o kitas jos kompleksų koordinaciją. Taigi, žinodami, kaip kinta šie du parametrai, galime iškart bent jau kokybiškai nusakyti sistemos struktūros pokyčius.

FA modelis puikiai paaiškina fluorescencijos gesimo kinetikas FSII-oje [10–12]. FSI fluorescencijos gesimo kinetikų daugiaeksponentiškumą taip pat galima paaiškinti FA modeliu. Dėl FSI-oje esančių laikinų sužadavimo lokalizacijos mazgų judėjimo, sužadavimo kelias link RC pastoviai kinta. Tad vienas iš šio darbo tikslų yra *pirmą kartą parodyti, kad FA modelį galima pritaikyti FSI eksperimentinių fluorescencijos gesimo kinetikų aprašymui*.

Tilakoidas yra sudarytas iš FSI ir FSII, todėl tilakoido fluorescencijos gesimo kinetiką ga-



2 pav. Pirmą ir antrą tilakoido būseną. Antroje būsenoje FSI prisijungia dalį LHCII kompleksų. Paveikslėlis iš [8] šaltinio.

lima aprašyti FSI ir FSII kinetikų suma. Kadangi abiejų fotosistemų fluorescencijos gesimo kinetikas galime aprašyti FA modeliu, tai, žinodami tilakoido kinetiką, galime rasti FA modelio parametrus abejoms fotosistemoms. Tad kitas šio darbo tikslas yra *iš tilakoido fluorescencijos gesimo kinetikų, gautų prie skirtingų apšvity, rasti FA modelio parametrus pirmai bei antrai fotosistemoms.*

Tilakoido struktūra priklauso nuo aplinkos veiksnių ir yra kintanti. Kai kurie šaltiniai teigia, kad tilakoidui pereinant į antrą būseną FSI nekinta [7]. Tuo tarpu kiti šaltiniai teigia, kad FSI prisijungia dalį nuo FSII atitrūkusių LHCII kompleksų [13]. FA modelio parametrai suteikia informacijos apie fotosistemos struktūrą. Todėl pagrindinis šio darbo tikslas yra *remiantis FA modeliu atpažinti tilakoido struktūrą bei įvertinti jos pokyčius besikeičiant aplinkos sąlygoms.*

Šio darbo aprašas susideda iš 5 skyrių. Pirmajame aprašytas FA modelis, paaiškinantis fluorescencijos gesimo kinetikas fotosistemose. Antrajame – šiuo modeliu aprašytos FSII fluorescencijos gesimo kinetikos. Trečiajame – šiuo modeliu aprašytos FSI kinetikos bei pagal gautus parametrus įvertintos skirtingų sistemų struktūros. Ketvirtajame skyriuje FA modelis buvo pritaikytas iš tilakoidų fluorescencijos kinetikų nustatyti FS-ų ir FSII-ų struktūras bei jų pokyčius, keičiantis aplinkos veiksniams. Penktajame skyriuje aprašytas gautas nevienareikšmiškumas ieškant FA modelio parametrų tilakoidui. Pasiūlytas būdas, kaip šio nevienareikšmiškumo galima išvengti, panaudojant dirbtinius neuroninius tinklus. Darbo pabaigoje suformuluotos išvados.

1 Fliktuojančių antenų modelis

Fliktuojančių antenų (FA) modelis detalai aprašytas [10] šaltinyje. Čia pateikiamos pagrindinės modelio idėjos.

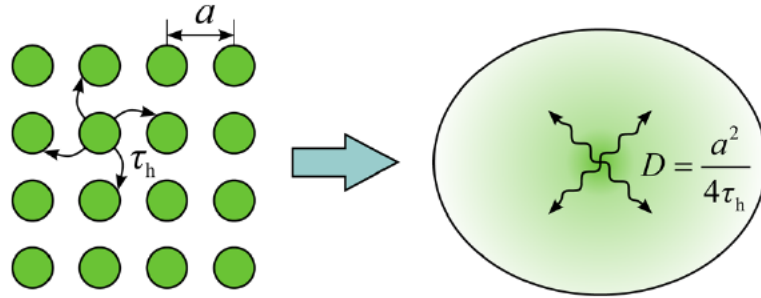
Pagal *coarse-grained* (CG) modelį [14] sužadinimo migraciją antenoje aprašo pagrindinė kinetinė lygtis:

$$\frac{d}{dt}p_i(t) = \sum_j k_{j \rightarrow i} p_j(t) - \sum_j k_{i \rightarrow j} p_i(t), \quad (1)$$

čia $p_i(t)$ yra tikimybė sužadinimui, laiko momentu t , būti i -tajame komplekse, o $k_{i \rightarrow j}$ perėjimo sparta iš komplekso i į kompleksą j . Esant idealiai kvadratinei gardelei, kurioje šuoliai vyksta tik tarp kaimyninių kompleksų ir esant pastoviam šuolių tarp kompleksų laikui $\tau_h = k_{i \rightarrow j}^{-1}$, pagrindinę kinetinę lygtį (1) galime aproksimuoti sužadinimo difuzijos lygtimi dvimatėje terpėje (3 pav.):

$$\frac{\partial}{\partial t} p(x, y, t) = D \nabla^2 p(x, y, t) \quad (2)$$

čia $\nabla^2 = (\partial^2/\partial x^2) + (\partial^2/\partial y^2)$ yra dvimatis Laplaso operatorius, $p(x, y, t)$ sužadinto krūvio tankis taške (x, y) laiko momentu t , $D = a^2/(4\tau_h)$ sužadinto krūvio difuzijos konstanta.



3 pav. Sužadinimo šuolių tarp kompleksų uždavinį galime pakeisti difuzijos uždaviniu [10].

FSII kompleksų ir reakcijos centrų padėtys yra pilnai apibrėžtos, tačiau jungtys tarp jų – ne, jos laikui bėgant kinta. Šis jungčių neapibrėžtumas lemia vis kitokią sužadinimo judėjimo trajektoriją, o šių trajektorijų ansamblio suvidurkinimas ir nulemia daugiaeksponentinę fluorescencijos gesimo kinetiką.

Tam, kad nereikėtų atsižvelgti į atsitiktinį sužadinimo kelią, chloroplasto molekulės diskretumas ignoruojamas ir tariama, kad sužadinimas juda tolygia terpe. Jungčių tarp antenų įvertinimui įvedama trupmeninė medžiagos dimensija d . Daroma prielaida, kad taškinis sužadinimas išnyksta, nukeliavęs iki RC. Kiekvienam sužadinimui šis atstumas R yra atsitiktinis. Laikinė sužadinimo evoliucija tokioje sistemoje gali būti aprašyta difuzijos lygtimi:

$$\frac{\partial}{\partial t} p(\vec{r}, t | R) = D \nabla_d^2 p(\vec{r}, t | R) \quad (3)$$

su pradinėmis sąlygomis $p(\vec{r}), t = 0 | R = \delta(\vec{r})$ ir absorbuojančios sienelės kraštinėmis sąlygomis:

$$p(\vec{r}, t | R) |_{|\vec{r}|=R} = 0, \quad (4)$$

čia $p(\vec{r}, t | R)$ sužadavimo tankis laiko momentu t ; D - difuzijos koeficientas; $\delta(\vec{r})$ - Dirako delta funkcija aprašanti taškinį sužadimą (atitiktų atskiro komplekso sužadimą CG modelyje). Dėl sferinės simetrijos Laplasianas ∇_d^2 priklauso nuo atstumo r ir sistemos dimensijos d :

$$\nabla_d^2 = \frac{\partial^2}{\partial r^2} + \frac{d-1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \quad (5)$$

Išsprendus (3) lygtį bei sprendinį suintegravus per visą sistemos tūrį, gautas rezultatas suvidurkinamas pagal visas atstumo iki reakcijos centro realizacijas:

$$\bar{P}(t) = \int_0^\infty P(t | R(V)) c e^{-cV} dV \quad (6)$$

Tuomet gaunama relaksacijos kinetikos funkcija, kuri laiko asimptotikoje įgauna tokį pavidalą.

$$\bar{P}(t) \simeq A_d (c^{2/d} D t)^{d/(2d+4)} \exp[-\kappa_d (c^{2/d} D t)^{d/(d+2)}], \quad (7)$$

čia:

$$\kappa_d = \frac{2+d}{d} \left[\frac{(\xi_{d/2-1}^{(1)} \sqrt{\pi})^d}{\Gamma(\frac{d}{2})} \right]^{\frac{2}{d+2}}, \quad (8)$$

ir:

$$A_d = \frac{8}{2^{d/2} \sqrt{2+d}} \frac{1}{\xi_{d/2-1}^{(1)}} \left[\frac{\pi^{d+1} (\xi_{d/2-1}^{(1)})^{\frac{d^2}{2}-1}}{(\Gamma(\frac{d}{2}))^{d+3}} \right]^{\frac{1}{d+2}}, \quad (9)$$

čia $\Gamma(d/2)$ - gama funkcija, $J_{d/2-1}(\xi)$ - Beselio funkcija; $\xi_{d/2-1}^{(n)}$ yra n -tojo Beselio funkcijos nulio reikšmė, t.y. $J_{d/2-1}(\xi_{d/2-1}^{(n)}) = 0$. Dydį $[Dc^{2/d}]^{-1}$ pažymėsime raide τ .

Fotosistemos relaksacijos kinetika aprašoma dviem nežinomais parametrais: sistemos dimensija d ir difuzijos koeficiento bei koncentracijos funkcija $Dc^{2/d}$. Struktūrų koncentraciją fotosistemose yra

$$c \simeq \frac{1}{Na^d} \quad (10)$$

čia N yra vidutinis kompleksų skaičius vienam RC, a^d – vidutinis kompleksų užimamas tūris d dimensijos erdvėje. Difuzijos konstantą galime susieti su vidutine šuolių tarp kompleksų trukme τ_h sąryšiu:

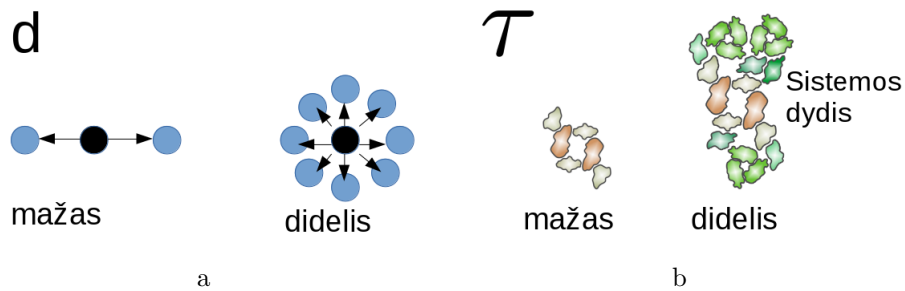
$$D \simeq \frac{a^2}{2d\tau_h} \quad (11)$$

Iš (10) ir (11) lygčių gauname sąryšį, kuris susieja vieną iš (7) lygties parametrų su kompleksų

skaičiumi fotosistemoje:

$$\tau = [Dc^{2/d}]^{-1} = 2d\tau_h N^{2/d}. \quad (12)$$

FA modelis yra geras tuo, kad sistemą aprašo tik dviem parametrais: dimensijos parametru d ir trukmės parametru τ . Šie parametrai apibūdina sistemos struktūrą (4 pav.). Prie didesnės dimensijos bus geresnė kompleksų koordinacija, t.y. kompleksai turės daugiau kaimynų. Trukmės parametras nusako sistemos dydį. Kuo didesnis τ , tuo daugiau kompleksų sudaro sistemą.

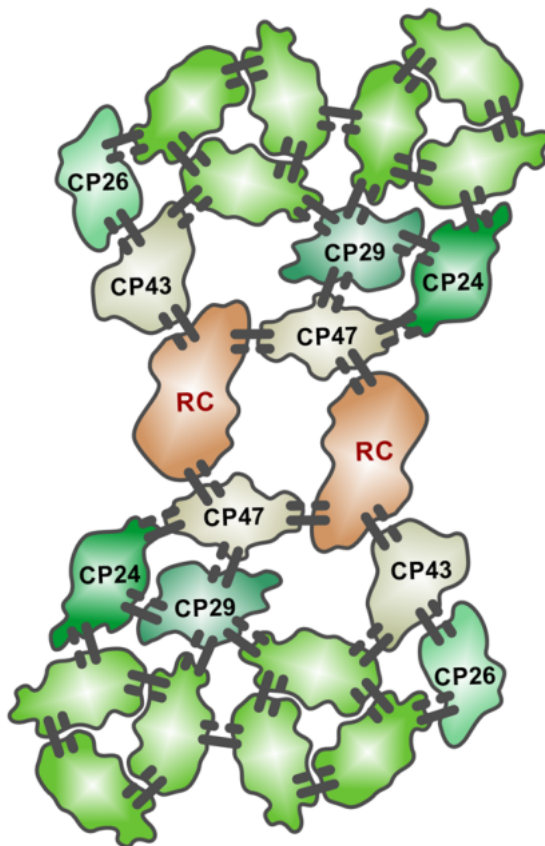


4 pav. FA modelį aprašantys parametrai d ir τ yra susiję su nagrinėjamos sistemos struktūra. (a) – parametras d atspindi kompleksų koordinaciją (parodo į kiek kaimyninių kompleksų gali peršokti sužadinimas); (b) – trukmės parametras τ atspindi sistemos dydį (kompleksų skaičių antenoje).

2 Antroji fotosistema

2.1 Antrosios fotosistemos sandara

Antroji fotosistema (FSII) yra svarbi tuo, kad fotosintezės metu kaip šalutinį produktą išskiria deguonį. FSII susideda iš branduolio, kuriame yra reakcijos centras (RC), bei šviesą sugeriančių kompleksų (LHCII), sudarančių išorinę anteną (5 pav.).



5 pav. FSII struktūros pavyzdys. FSII superkomplekso $C_2S_2M_2$ struktūrinė schema. FSII branduolį sudaro reakcijos centras (RC) bei šviesą sugeriantys kompleksai CP43 ir CP47. Likę kompleksai sudaro LHCs. Pilkos linijos žymi galimą sužadavimo energijos sklaidimo kelią. Punktyrinės linijos žymi dėl kompleksų tarpusavio judėjimo kintantį energijos perdavimo koeficientą tarp kompleksų [10].

FSII branduolyje yra RC, sudarytas iš 6 chlorofilų a, 2 peofitinų, bei šviesą sugeriantys kompleksai CP43 bei CP47. CP43 ir CP47 savyje turi atitinkamai 13 ir 16 chlorofilų a bei keliolika β -karotinoidų. Fotosistemos branduolyje yra mažas pigmentų/baltymų santykis, todėl jis šviesos sugerties nevykdo efektyviai. Sužadavimo perdavimas tarp CP43/CP47 ir RC dėl didelio atstumo tarp šių kompleksų yra lėtas (40-50 ps). Sužadavimo vidutinė gyvavimo trukmė branduolyje viršija 100ps [15]. Kadangi tai smarkiai viršija vidutinę sužadintos būsenos gyvavimo trukmę chlorofiluose (~ 2 ns), todėl FSII turi didelį kvantinį efektyvumą (~ 95 %).

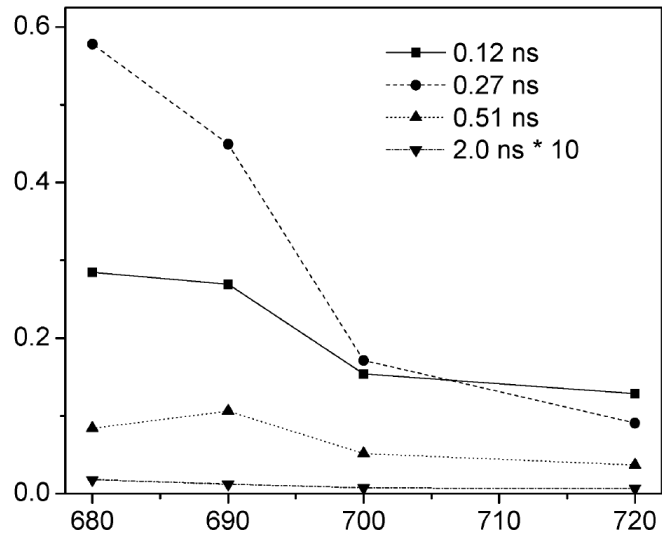
Aplink FSII branduolį yra išorinė antena, sudaryta iš šviesą sugeriančių kompleksų (angl. *light-harvesting complexes* - LHCs), kurie sugeria didžiąją dalį šviesos bei jos energiją perduoda į RC. LHCs pigmentų/proteinų santykis yra gerokai didesnis (1:2 pagal masę augaluose, 1:5 bakterijose [16]), todėl jų šviesos sugerties skerspjūvis yra gerokai didesnis. Taigi LHCs dėl didesnio užimamo ploto bei didesnio sugerties skerspjūvio sugeria gerokai daugiau šviesos nei sistemos branduolys. Be efektyvios šviesos sugerties LHCs atlieka dar vieną funkciją. Atsižvelgdama į apšvitą, reguliuoja, kurią dalį ir kaip sparčiai sugertą energiją perduoti į RC. Po krūvio atskyrimo RC-as negali iškart priimti sekančio energijos kvanto ir turi praeiti tam tikras laiko tarpas kol jis atsistatys. Esant mažai apšvitai, tam, kad sugertų daugiau šviesos, LHCs padidėja. Esant didelei apšvitai, fotosistemos reakcijos centras nespėja priimti visų sužadinių ir užsiblokuoja. Tuomet pailgėja sužadavimo išbuvimo chlorofilo a trukmė, o tai padidina chlorofilo tripletinės būsenos susidarymo tikimybę. Tripletinės būsenos chlorofilas, reaguodamas su deguonimi, jo būseną pakeičia į singletinę. Singletinės būsenos deguonis yra smarkus oksidatorius, galintis oksiduoti pigmentus, lipidus ir baltymus, taip padarydamas nepataisomą žalą FSII [17]. Todėl, esant didelei apšvitai, kad išvengtų pažeidimų, LHCs sumažėja. LHCs antenos dydis ir struktūra taip pat priklauso nuo užauginimo sąlygų ir kiekviename skirtingame augusiame augale, bakterijoje ar dumblyje LHCs antena bus kitokia. LHC daugiausia susideda iš tankiai susispaudusių chlorofilo a ir chlorofilo b pigmentų, kurie atsakingi už šviesos sugertį. Atstumai tarp chlorofilų yra apie 10Å, todėl juos veikia eksitoninė sąveika, kuri lemia greitą energijos perdavimą komplekso viduje. Tarp atskirų kompleksų energijos perdavimas vyksta gerokai lėčiau.

2.2 Fliktuojančių antenų modelio taikymas antros fotosistemos struktūros nustatymui

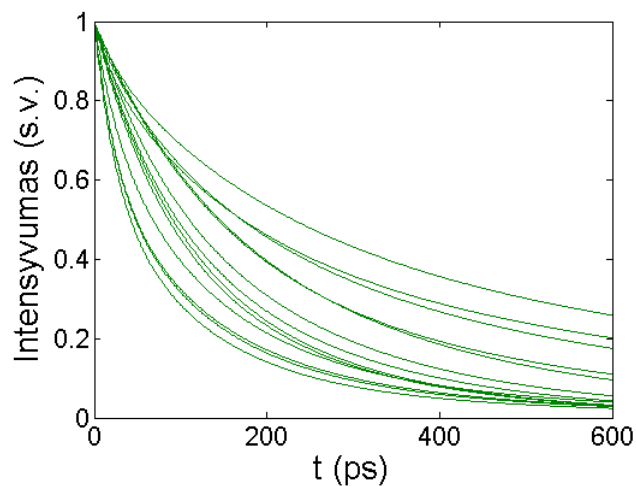
Iš ankstesnių darbų žinome, kad FA modeliu galima paaikškinti FSII fluorescencijos gesimo kinetikas [10–12]. [10] straipsnyje teigiama, kad FSII-ai FA modelį galima taikyti dėl to, kad FSII-oje išoriniai antenų kompleksai tarpusavyje juda ir, keičiantis atstumui tarp atskirų kompleksų, keičiasi keliai, kuriais gali keliauti sužadavimas link RC (5 pav.).

Šiame darbe FA modeliu buvo aprašinėjamos FSII fluorescencijos gesimo kinetikos, gautos prie daugiau įvairių eksperimentų. Iš viso FA modeliu buvo aprašyta 13 FSII fluorescencijos kinetikų augalams iš šių šaltinių [12, 14, 18–22]. Šiuose šaltiniuose dauguma kinetikų yra aprašytos trimis eksponetėmis su skirtingomis gesimo trukmėmis, kurių ilgiai varijuoja intervaluose 10-70ps, 200-300ps ir 400-600ps. Taip pat šios fotosistemos dar turi ir mažos amplitudės (~1%) ilgąją komponentę, kurios gesimo trukmė yra virš 1.5 ns. Chlorofiluose izoliuotuose nuo RC sužadavimas relaksuoja su ~2ns vidutine gyvavimo trukme [23]. Dėl to ši ilgiausia komponentė būdavo atmetama teigiant, kad jos prigimtis yra nesusijusi su sužadavimo judėjimu link RC. Taip pat kai kuriuose šaltiniuose būdavo pateikiama ir trumpoji komponentė su trukme <5ps.

Jos prigimtis yra sužadavimo persiskirstymas tarp chlorofilo a ir chlorofilo b. Dėl to ji taip pat būdavo atmetama. Vienuose šaltiniuose pateikti eksponenčių trukmių koeficientai jau buvo suintegruoti per visus bangos ilgius. Kituose šaltiniuose eksponenčių koeficientų reikšmės pateiktos prie skirtingų bangos ilgių (pvz. 6 pav.). Tokiu atveju koeficientų reikšmės būdavo suintegruojamos per visus bangos ilgius ir perskaičiuojamos taip, kad kinetika būtų normuota į vienetą. Visos FSII kinetikos, kurias buvo bandyta aprašyti FA modeliu, pavaizduotos 7 pav. Visų jų vidutinė gyvavimo trukmė kinta nuo 104ps iki 507ps.



6 pav. Komplekso B3 fluorescencijos gesimo kinetikos koeficientai prie skirtingų detekcijos bangos ilgių. Iš [21] šaltinio 4pav.



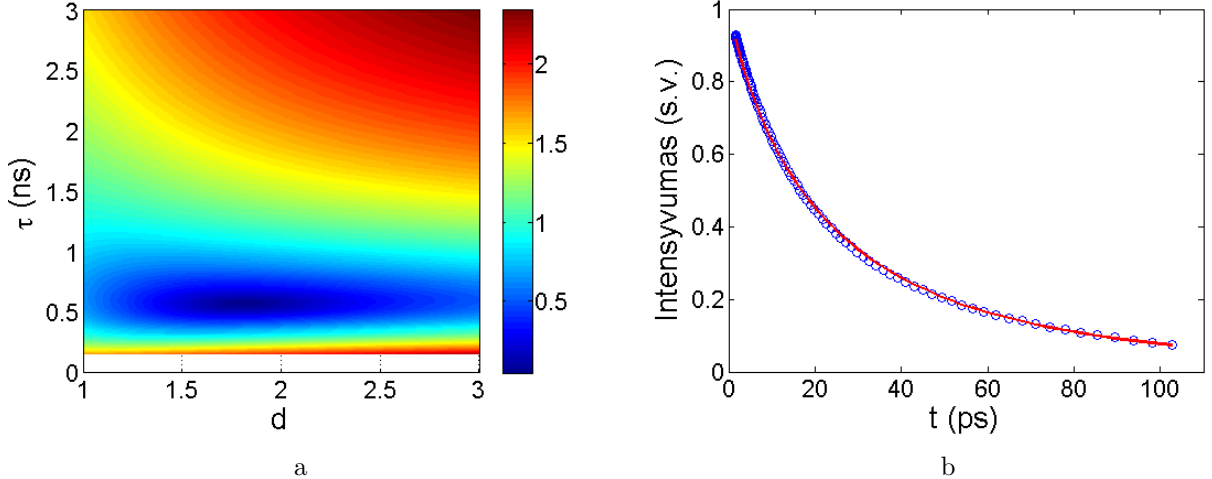
7 pav. Eksperimentinės FSII-os fluorescencijos kinetikos naudotos ieškant FA modelio parametrų [14, 18–22].

Turint eksperimentines kinetikas, buvo tikrinta, ar jų aprašymas FA parametrais yra unimodalinis ar daugiamodalinis. Tuo tikslu buvo pasirinkta eksperimentinė kinetika B9 kompleksui

iš [21] šaltinio. Buvo skaičiuojamas vidutinis kvadratinis nuokrypis tarp eksperimentinės bei FA modelio kinetikos taškų prie skirtingų FA modelio parametrų verčių. FA modelio dimensijos parametras d keistas nuo 1 iki 3, trukmės parametras τ nuo 0.25 ns iki 3 ns. Laiko momentai, kuriuose buvo skaičiuoti funkcijų skirtumai, buvo pasirinkti pagal laipsninį dėsnį

$$t_n = t_{visas}^{\frac{n}{N}}, \quad (13)$$

tam, kad kinetikos pradžioje ten, kur funkcija kinta greičiau, būtų paimta daugiau taškų, o kinetikos pabaigoje, kur kitimas nežymus – mažiau. Čia t_n - n -asis laiko momentas, t_{visas} - laikas, iki kurio buvo lyginamos kinetikos, N - lygintų taškų skaičius. Komplexo B9 kinetikos vidutinė gyvavimo trukmė yra 115 ps, todėl t_{visas} buvo 345 ps kas yra lygu trims vidutinėms kinetikos trukmėms. 8a pav. yra pavaizduota, kaip vidutinis kvadratinis nuokrypis priklauso nuo FA modelio parametrų d ir τ . Čia matosi svarbus dalykas, kad egzistuoja tik vienas minimumas, ir tai reiškia, kad šią eksperimentinę kinetiką galima aprašyti vienareikšmiais FA modelio parametrais. FA modelio kinetika, geriausiai atitinkanti eksperimentinę kinetiką, atvaizduota 8b pav. Taip pat buvo tikrinta, kokią įtaką optimalių parametrų radimui daro trukmė, iki kurios yra lyginamos kinetikos, bei lyginamų taškų skaičius. Čia buvo pastebėta, kad keičiant šiuos parametrus kinta ir optimalių FA modelio parametrų vertė, tačiau šis kitimas nėra žymus.

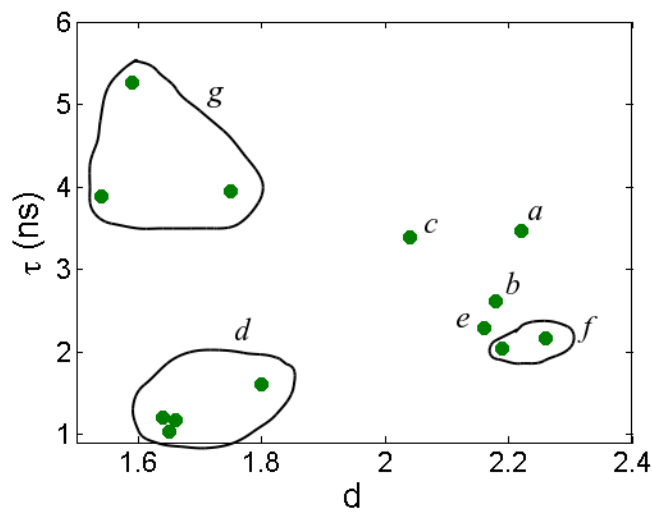


8 pav. (a) - Komplexo B9 eksperimentinės fluorescencijos kinetikos skirtumas nuo FA modelio kinetikos prie skirtingų FA parametrų verčių, (b) - Komplexo B9 eksperimentinės kinetikos palyginimas su FA modelio optimalia kinetika. Taškai - eksperimentinė kinetika, raudona linija - optimali FA modelio kinetika. Eksperimentinė B9 kinetika paimta iš [21] šaltinio.

Visoms 13-ai 7 pav. pateiktų FSII fluorescencijos gesimo kinetikų buvo ieškota optimalių FA modelio parametrų. Parametrų ieškota pagal patikimosios srities atspindžio (angl. *trust region reflective*) algoritmą [24]. Šiame algoritme buvo lyginta 100 eksperimentinės kinetikos ir FA modelio kinetikos taškų, laiko momentais parinktais pagal laipsninį dėsnį (13). Laikas, iki

kurio buvo lygintos šios kinetikos, lygus trims vidutinėms eksperimentinės kinetikos gyvavimo trukmėms.

9 pav. yra pavaizduoti gauti FA modelio parametrai eksperimentinėms kinetikoms. Čia matome, kad FA modelio trukmės parametras τ kinta nuo ~ 1 ns iki ~ 5.5 ns. 9 pav. d raide pažymėti taškai yra iš šio šaltinio [21]. Šie taškai priklauso išsegmentuotiems bandiniams, kurie yra labai maži ir natūraliai tokio dydžio neegzistuoja. Atmetus šiuos bandinius, gauname, kad parametras τ kinta nuo ~ 2 ns iki ~ 5.5 ns. Kadangi visiems FSII bandiniams trukmės parametras yra didesnis už 2 ns, tai reiškia, kad visos FSII yra didelės sistemos. FA modelio dimensijos parametras kinta nuo ~ 1.5 iki ~ 2.3 . Tai parodo, kad FSII dalis sistemų sudaryta iš smarkiai fluktuojančių kompleksų ($d < 2$), o dalyje kompleksų fluktuacijos nėra žymios ($d > 2$).



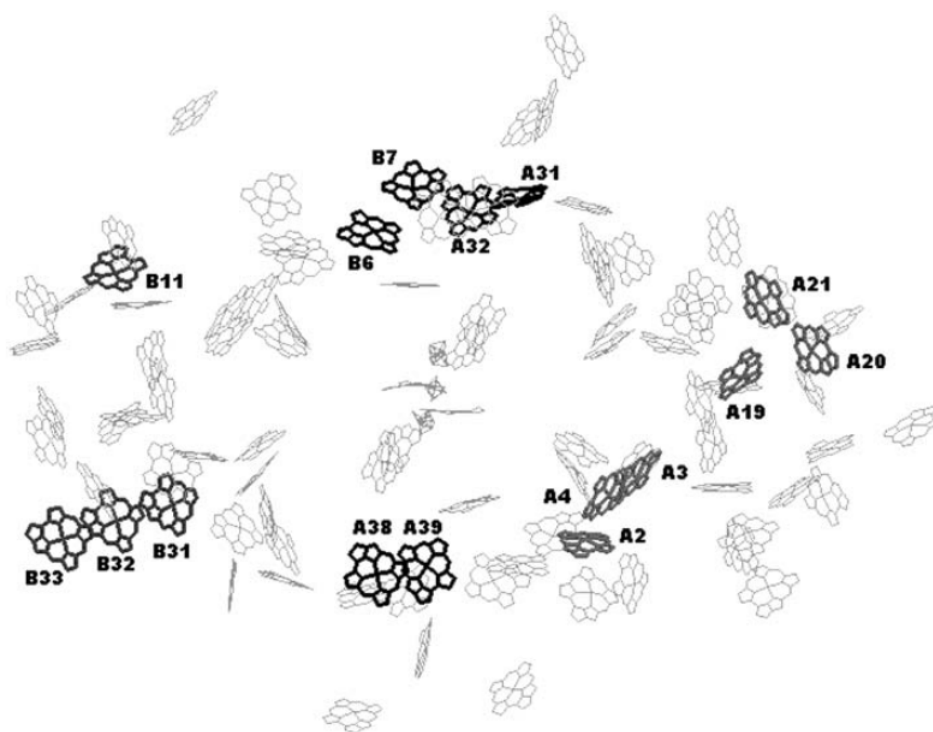
9 pav. FSII-os FA modelio parametrai augalams. a - [18], b - [19], c - [20], d - [21], e - [14], f - [22], g - [12].

3 Pirmoji fotosistema

3.1 Pirmosios fotosistemos sandara

Pirmoji fotosistema (FSI) turi patį efektyviausią gamtoje žinomą šviesos konvertavimo mechanizmą, kurio kvantinis efektyvumas yra labai arti 100% [25]. Tai reiškia, kad po fotono sugerties sužadینimas labai greitai nukeliauja iki RC, kur įvyksta krūvio atskyrimas. Sužadینimo perdavimo sparta susijusi su atstumais tarp pigmentų.

FSI, taip pat kaip ir FSII, susideda iš branduolio ir LHC kompleksų, sudarančių išorinę anteną. Lyginant su FSII, sistemos branduolys yra daug didesnis. Įvairių rūšių FSI-om, sistemos branduolio struktūra yra panaši. Tuo tarpu išoriniai sluoksniai priklauso nuo fotosistemos tipo bei aplinkos veiksnių.



10 pav. FSI branduolio struktūra. Žemos energijos pigmentai, atliekantys laikinų sužadینimo lokalizacijos mazgų funkciją (tamsios struktūros) ir reakcijos centras (centre). Paveikslėlis iš [26] šaltinio.

FSI branduolys susideda iš maždaug 100 chlorofilų a. Pavyzdžiui, cianobakterijoje jis susideda iš 96 chlorofilų a ir 22 β -karotioidų [27]. Bakterijose branduolys sudarytas iš trimerų, o augaluose – iš monomerų. Atstumai tarp gretimų pigmentų centrų yra apie 10 Å, dėl to energijos perdavimas tarp jų vyksta labai sparčiai (100 - 200 fs [28]). Taip pat FSI branduolyje yra žemos energijos raudonųjų pigmentų [29]. Šie pigmentai sudaryti iš eksitonine sąveika surišusių chlorofilo molekulių. Jie veikia kaip laikini sužadینimo lokalizacijos mazgai. Šiuose raudonuose pigmentuose vidutinė sužadینimo gyvavimo trukmė yra apie 18 ps [30]. Raudonieji pigmentai

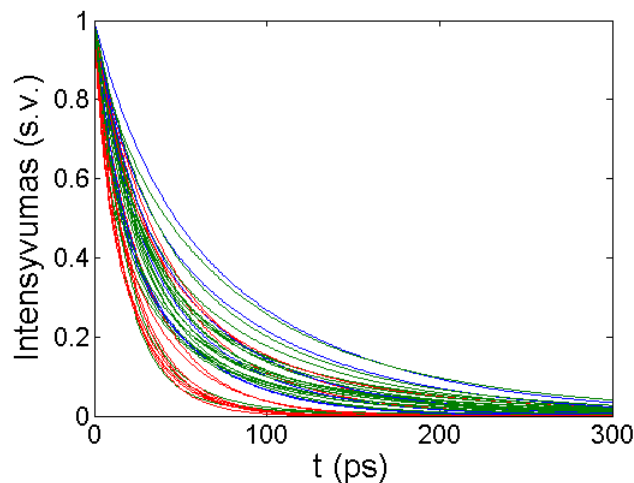
daro didelę įtaką vidutiniam laikui, per kurį sužadینimas pasieks reakcijos centrą. Vidutiniškai sužadınimo gyvavimo trukmė branduolyje kinta nuo 20 ps iki 40 ps.

Išoriniai šviesą sugeriantys kompleksai (LHCI) susideda iš chlorofilų a ir b. Išorinę anteną sudaro keturi Lhca kompleksai (Lhca1-4), susijungę porom (Lhca1-4 ir Lhca2-3). Kiekvienas Lhca kompleksas susideda iš 13-14 chlorofilų. Chlorofilų a ir b santykis antenoje lygus 3.7. Lhc1 ir Lhc2 branduoliui sužadınimą perduoda vidutiniškai per 10 ps. Tuo tarpų Lhc3 ir Lhc4 per 40 ps. Antenos kompleksuose, taip pat kaip ir branduolyje, egzistuoja raudonieji pigmentai, laikinai pagaunantys sužadınimą. Būtent dėl jų ir skiriasi laikas, per kurį sužadınimas pasiekia branduolį. Bendra FSI-LHCI komplekso sužadınimo gyvavimo trukmė yra apie 50 ps.

FSI-LHCI struktūra su raudonaisiais pigmentais pateikta 10 pav. Dėl raudonų pigmentų konformacinio judėjimo, sužadınimo kelias link RC pastoviai kinta. Taigi, galime daryti prielaidą, kad ir FSI-ai galime taikyti FA modelį. Tik šiuo atveju laikysime, kad sužadınimas šokinėja ne tarp atskirų fotosistemos kompleksų, bet tarp laikinųjų sužadınimo lokalizacijos mazgų funkciją atliekančių raudonųjų pigmentų.

3.2 Fliktuojančių antenų modelio taikymas pirmos fotosistemos struktūros nustatymui

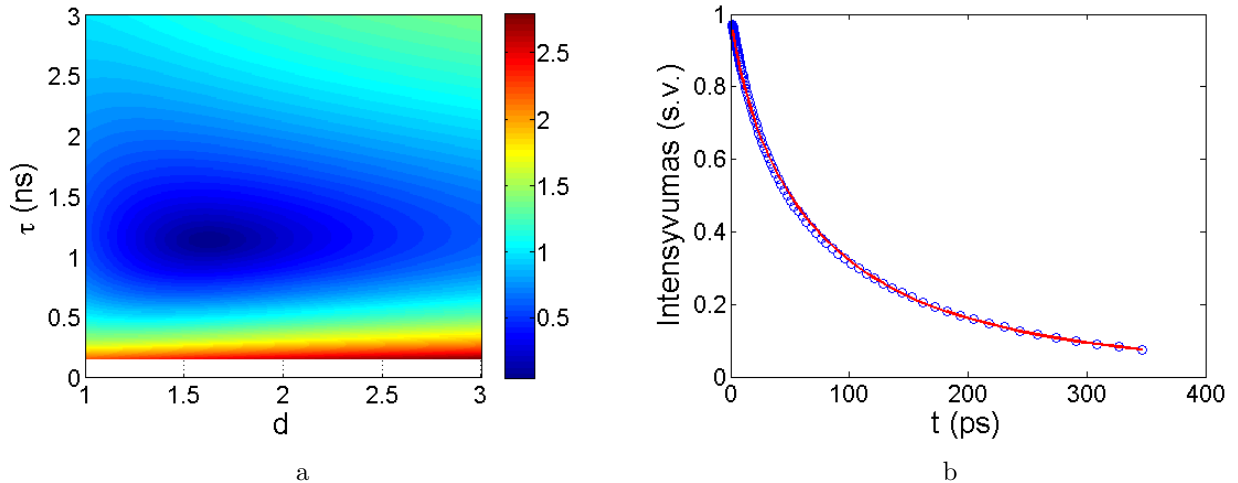
Šiame darbe FA modeliu buvo aprašytos 39-ios FSI-os fluorescencijos gesimo kinetikos paimitos iš šių šaltinių [31–49]. Eksperimentinių kinetikų pateikimas šiuose straipsniuose yra analogiškas kaip ir FSII-ai (aprašytas 2.2 skyriuje). Gautų kinetikų vidutinė gesimo trukmė kinta nuo 21 ps (FSI branduoliui) iki 83 ps. Gautos kinetikos pateiktos 11 pav.



11 pav. Eksperimentinės FSI fluorescencijos kinetikos naudotos ieškant FA modelio parametru. Žalia - augalai [31–40], raudona - bakterijos [41–46], mėlyna - dumbliai [47–49].

Buvo tikrinta, ar FSI fluorescencijos gesimo kinetikų aprašymas FA parametrais yra unimodalinis ar daugiamodalinis. Tuo tikslu, analogiškai kaip ir FSI-os atveju, buvo skaičiuotas

kvadratinis nuokrypis tarp eksperimentinės ir FA modelio kinetikos prie skirtingų FA modelio parametrų verčių. Tyrimui buvo pasirinkta augalo FSI-LHCI fluorescencijos gesimo kinetika iš [31] šaltinio. Kvadratinio nuokrypio vertės dydis priklausomai nuo FA modelio parametrų verčių pateiktas 12a pav. Čia, kaip ir FSII atveju, matome, kad egzistuoja tik vienas minimumas. Optimaliausios FA modelio kinetikos palyginimas su eksperimentine kinetika pateiktas 12b pav.

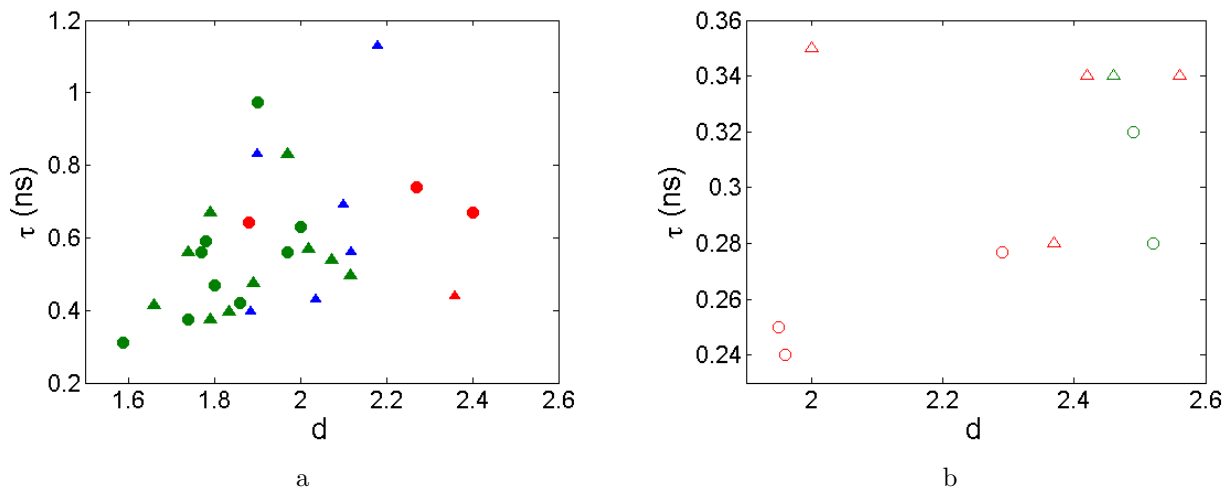


12 pav. (a) - FSI-LHCI eksperimentinės fluorescencijos kinetikos skirtumas nuo FA modelio kinetikos prie skirtingų FA parametrų verčių, (b) - FSI-LHCI eksperimentinės kinetikos palyginimas su FA modelio optimalia kinetika. Taškai - eksperimentinė kinetika, raudona linija - optimali FA modelio kinetika. FSI-LHCI kinetika paimta iš [21] šaltinio.

Šioms 39 eksperimentinėms kinetikoms buvo ieškota optimalių FA modelio parametrų pagal patikimosios srities atspindžio metodą analogiškai kaip ir FSII (2.2 skyrius). Visos šios eksperimentinės kinetikos buvo suskirstytos į FSI branduolių kinetikas (10 kinetikų) ir į FSI su išoriniais antenų kompleksais kinetikas (29 kinetikos).

FSI-os su išoriniais kompleksais kinetikos buvo suskirstytos į augalų (19 kinetikų [31–40]), bakterijų (4 kinetikos [41–43]) ir dumblių (6 kinetikos [47–49]) kinetikas. Taip pat suskirstytos pagal žadinimui naudoto lazerio bangos ilgį. Žadinimo bangos ilgiai šiuose eksperimentuose buvo 400 nm, 410 nm, 440 nm, 475 nm, 632 nm ir 670 nm. 440 nm bangos ilgis žadina chlorofilą a bei karotinoidus, o 670 nm - chlorofilą a [34]. Karotinoidai bei chlorofilai a homogeniškai pasiskirstę visoje sistemoje. Todėl laikome, kad šie bangos ilgiai molekulę žadina homogeniškai. Likę bangos ilgiai labiau žadina chlorofilą b, kuris yra periferinėje sistemos dalyje. Dėl to laikome, kad šie bangos ilgiai žadina sistemos periferiją. FA parametrų tarpusavio priklausomybė pateikta 13a pav. Čia matome, kad FA modelio trukmės parametro τ ribos yra tarp ~ 0.3 ns ir ~ 1.15 ns. Būtent šiuo parametru FSI ir skiriasi nuo FSII, kurioms $\tau > 2$ ns. Dimensijos parametro d ribos panašios kaip ir FSII-os: nuo ~ 1.6 iki ~ 2.4 . Palyginus dimensijos vertes pagal organizmų rūšis, matome, kad augalai turi mažiausią dimensiją: nuo ~ 1.6 iki ~ 2.1 , o tuo

tarpu, trijuose iš keturių eksperimentų su bakterijomis, dimensija buvo tarp 2.2-2.4. Didesnis dimensijos parametras bakterijose reiškia, kad jų FSI yra kompaktiškesnė ir geriau koordinuota nei augaluose. Dumbliuose dimensijos parametras kinta ribose 1.85-2.15, tačiau gavus daugiau eksperimentinių taškų šis intervalas tikriausiai būtų platesnis.



13 pav. (a) - FSI-os su išoriniais šviesą surenkančių antenų kompleksais FA modelio parametru tarpusavio priklausomybė. Žalia - augalams [31–40], raudona - bakterijoms [41–43], mėlyna - dumbliams [47–49]. Apskritimai vaizduoja homogeninio žadinimo atvejį (440 nm ir 670 nm), o trikampiai - periferinio; (b) - FSI-os branduolių FA modelio parametru tarpusavio priklausomybė. Žalia - augalams [34, 35], raudona - bakterijoms [42, 44–46].

FA modeliu taip pat sėkmingai pavyko aprašyti ir FSI branduolių fluorescencijos gesimo kinetikas (FSI branduolių kinetikos paimtos iš šių šaltinių [34, 35, 42, 44–46]). Gauta FA modelio parametru tarpusavio priklausomybė pavaizduota 13b pav. FA modelio trukmės parametras τ kinta nuo ~ 0.24 ps iki ~ 0.35 ps. FSI su kompleksais trukmės buvo gautos didesnės, o tai yra logiška, nes trukmės parametras atspindi fotosistemos dydį. FA modelio dimensijos parametras d kinta ribose 1.9-2.6. Bakterijoms jis panašus kaip ir FSI su kompleksais, o tuo tarpu augalų sistemoms dimensijos parametras yra didesnis. Tai parodo, kad augaluose išorinių kompleksų prisijungimas sumažina vidutinę sistemos kompleksų koordinaciją, o tą lemia lėtas išorinio komplekso sužadavimo perdavimas fotosistemos branduoliui.

FA modelio parametru palyginimas bandiniams žadintiems prie skirtingų bangos ilgių pateiktas 1 lentelėje. Čia palyginta, kaip keičiasi FA modelio parametrai keičiantis sužadavimo bangos ilgiui FSI branduoliui ir FSI su išorine antena. Matome, kad FSI branduoliui FA modelio parametrai beveik nekinta. Taip yra todėl, kad FSI branduolyje pigmentų pasiskirstymas yra daugmaž homogeniškas, kas reiškia, kad sužadavimo pasiskirstymui žadinimo bangos ilgis didelės įtakos neturi. Tuo tarpu, turint FSI su išoriniais kompleksais ir žadinant į išorinius kompleksus (475 nm), FA modelio trukmės parametras τ padidėja. Šis padidėjimą lemia tai, kad šiuo atveju sužadimui visada reikės nueiti didesnę kelią iki RC, negu homogeninio ža-

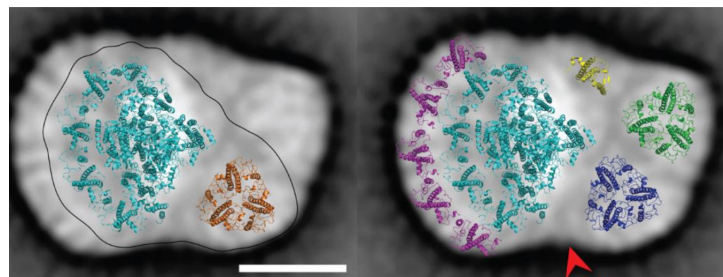
dinimo atveju. Dimensijos parametras d sumažėja, nes sužaditimui visada reikės peršokti iš išorinio komplekso į branduolį, o šuolio tikimybė į branduolį yra mažesnė nei šuolių tikimybė tarp laikinos lokalizacijos mazgų branduolyje arba išoriniame komplekse.

1 lentelė. FA modelio parametrų palyginimas FSI sistemoms žadintoms prie skirtingų bangos ilgių. 440 nm atitinka homogeninio žadinimo atvejį, 475 nm - periferinio. FA parametrai gauti pagal eksperimentines fluorescencijos gesimo kinetikas, paimtas iš [34] šaltinio.

Kompleksas	Sužadavimo bangos ilgis (nm)	d	τ (ns)	Vidutinė gyvavimo trukmė (ps)
branduolys	440	2.49	0.32	22
branduolys	475	2.46	0.34	23
branduolys + Lhca1-4	440	1.8	0.47	44
branduolys + Lhca1-4	475	1.74	0.56	54

3.3 Pirma fotosistema, prisijungusi antros fotosistemos kompleksus

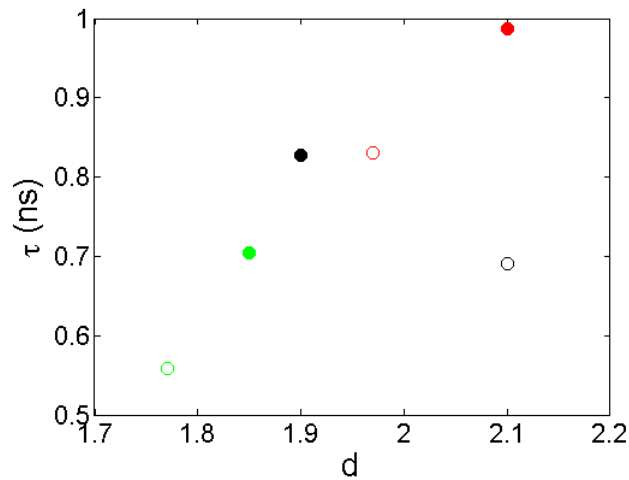
FSI ir FSII turi dviejų tipų antenas: vidines, kurios kartu su RC sudaro fotosistemos branduolį, ir išorines. FSI ir FSII vidinės antenos susideda atitinkamai iš 98 ir 35 chlorofilų [50]. Tuo tarpu išorinės antenos dydis kinta priklausomai nuo apšvitos ir augimo sąlygų. Tilakoido membranoje, esant stipriai apšvitai, dalis FSII išorinių kompleksų LHCII atsikabina ir pereina prie FSI. Šis procesas vadinamas būsenos pasikeitimu (iš I būsenos į II būseną). FSI-LHCII struktūra pavaizduota 14 pav. Mažiausias atstumas tarp LHCII ir FSI branduolio yra 18Å.



14 pav. FSI-LHCI-LHCII struktūros. Kairėje augale esančios struktūros branduolys prisijungęs keturis LHCI kompleksus (žydra) ir vieną LHCII kompleksą (ruda). Ciano bakterijoje esantis FSI branduolys prisijungęs devynis LHCI kompleksus (violetinė), du LHCII (žalia ir mėlyna) ir vieną CP29 (geltona). Paveikslėlis iš [49] šaltinio.

Šiame darbe buvo tirtos trys FSI su LHCII kompleksais kinetikos: viena dumblio, kitos dvi augalų. FSI-LHCI-LHCII bei FSI-LHCI fluorescencijos gesimo kinetikoms buvo rasti optimalūs FA modelio parametrai (15 pav.). FSI-LHCI-LHCII fluorescencijos kinetika dumblyje paimta iš [49] šaltinio. Ši kinetika palyginta su FSI-LHCI kinetika neturinčia LHCII (15 pav. juodi taškai). Prisijungus LHCII, FA modelio parametras τ padidėja nuo 0.7 ns iki 0.83 ns, tai yra

logiška, nes šis parametras atspindi sistemos dydį. Tuo tarpu dimensijos parametras d sumažėja nuo 2.1 iki 1.89. Dimensijos sumažėjimą galima aiškinti lėtu sužadavimo perdavimu iš LHCII į FSI branduolį. FSI-LHCI-LHCII fluorescencijos kinetikos augaluose paimtos iš [38, 40] šaltinių (15 pav. raudona ir žalia). Abiejų sistemų FA parametras τ padidėja panašiai kaip ir dumblio atveju nuo 0.83 ns iki 0.99 ns ir nuo 0.57 ns iki 0.71 ns. Parametras d , priešingai negu dumblyje, taip pat padidėja nuo 1.98 iki 2.1 ir nuo 1.77 iki 1.86. Šis padidėjimas reiškia pagerėjusią vidutinę sistemos kompleksų koordinaciją. Tai galėtų reikšti, kad augaluose sužadavimo perdavimas iš LHCII į FSI branduolį vyksta gerokai sparčiau nei dumbliuose.



15 pav. Tuščiaviduriai taškai atitinka FSI sistemą, o pilnaviduriai FSI su FSII kompleksais. Juodi dumbliai [49], raudoni ir žali augalai [38, 40].

4 Tilakoidai

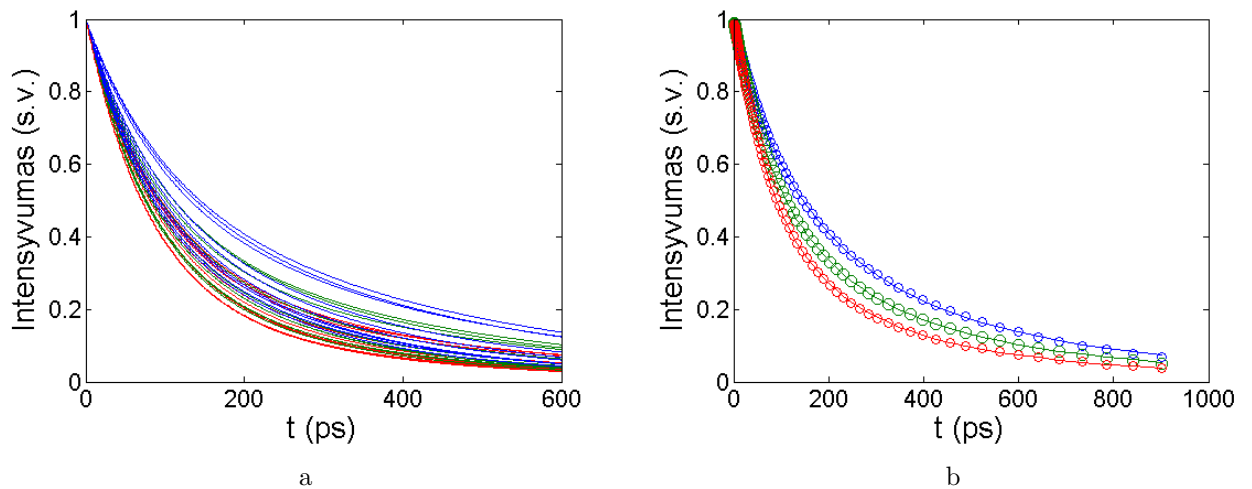
4.1 Fliuktuojančių antenų modelio taikymas tilakoido struktūros nustatymui

Į tilakoidų sudėtį įeina ir FSI, ir FSII, dėl to tilakoido fluorescencijos kinetika yra suminė FSI ir FSII kinetika:

$$F_{\text{tilakoido}} = cF_{\text{FSI}} + (1 - c)F_{\text{FSII}}, \quad (14)$$

čia c yra koeficientas, nurodantis FSI indėlį į tilakoido kinetiką. Taigi, eksperimentinei tilakoido fluorescencijos kinetikai buvo ieškoma iš viso 5 parametrų: d_1 , τ_1 , d_2 , τ_2 bei c .

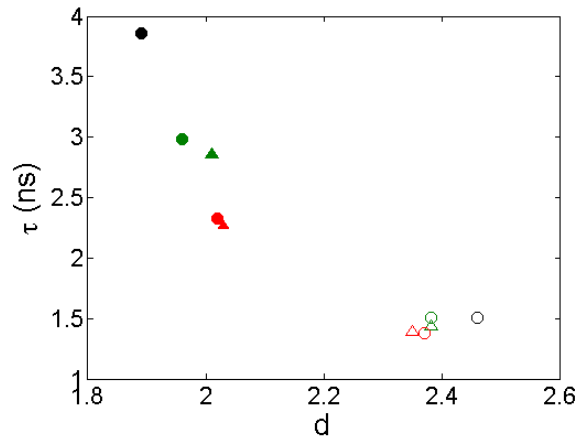
Tilakoido fluorescencijos kinetikos buvo imtos iš šių [5, 7, 51] šaltinių. Čia jos pateiktos prie trijų skirtingų detekcijos bangos ilgių 680 nm, 700 nm ir 720 nm (16a pav.). Akivaizdu, kad nuo detekcijos bangos ilgio tilakoiduose esančių FSI ir FSII struktūros nepriklauso, o priklauso tik FSI ir FSII fluorescencijos intensyvumų santykis. Dėl to buvo ieškoma iškart 7 parametrų, kurie geriausiai aprašytų iš karto 3 eksperimentines kinetikas: d_1 , τ_1 , d_2 , τ_2 , c_{680} , c_{700} bei c_{720} . Čia c_{680} , c_{700} ir c_{720} parodo FSI indėlį į tilakoido kinetiką atitinkamai 680 nm, 700 nm ir 720 nm detekcijos bangos ilgiams. 16b pav. pateiktas trijų eksperimentinių kinetikų ir jas geriausiai atitinkančių FA modelio kinetikų pavyzdys.



16 pav. (a) - Tilakoidų fluorescencijos kinetikos, esant skirtingiems detekcijos bangos ilgiams [5]. Mėlyna - 680 nm, žalia - 700 nm, raudona - 720 nm.; (b) - Tilakoido fluorescencijos eksperimentinės kinetikos (taškai) bei jas geriausiai atitinkantys FA modelio kinetikos (linijos), esant skirtingiems detekcijos bangos ilgiams. Mėlyna - 680 nm, žalia - 700 nm, raudona - 720 nm. Kinetika iš [5] šaltinio silpnos apšvitos sąlygomis.

4.2 Tilakoidų struktūros prie skirtingų apšvītų

Tirtas tilakoidų ilgalaikis prisitaikymas prie skirtingų apšvītų. Pirmos būsenos tilakoidų, augintų prie skirtingų apšvītų, kinetikos paimtos iš [5] šaltinio. Jas geriausiai atitinkantys FA modelio parametrai FSI ir FSII pateikti 17 pav. ir 2 lentelėje. Čia matome, kad FSI-om tilakoide būdingos ilgos vidutinės gyvavimo trukmės (~ 100 ps). Didelės FA modelio parametro τ vertės (nuo 1.35 ns iki 1.55 ns) parodo, kad tilakoiduose FSI yra labai didelės. Didėjant apšvītai, matomas nežymus parametro τ sumažėjimas (~ 0.1 ns), kas reikštų FSI sumažėjimą. Tuo tarpu FA modelio dimensijos parametras kinta labai nežymiai. FSII-oje, didėjant apšvītai, matosi ryškus trukmės parametro τ mažėjimas (nuo 4 ns iki 2 ns). Tai parodo, kad tilakoide, augančiame prie didesnės apšvītos, FSII išorinė antena yra mažesnė, nes vyksta lėtesnė LHCI kompleksų gamyba. FA modelio dimensijos parametras, didėjant apšvītai, šiek tiek padidėja (nuo 1.86 iki 2.02), kas parodo didesnį sistemos kompaktiškumą, esant didesnėms apšvītoms.



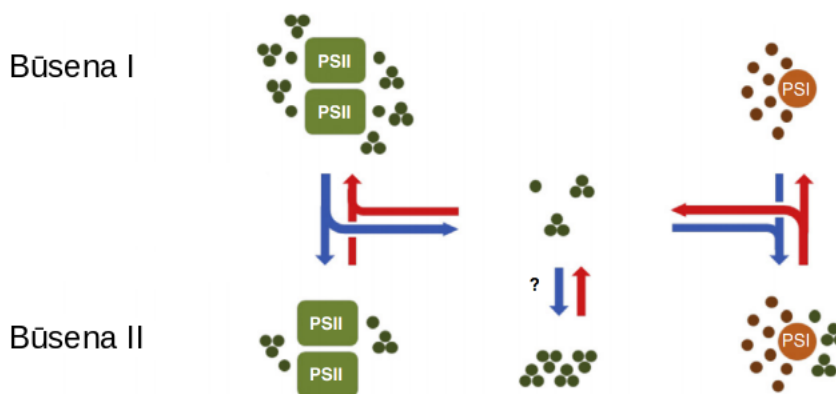
17 pav. Tilakoidų, augintų prie skirtingų apšvītų, FA modelio parametrai. Tuščiaviduriai taškai - FSI, pilnaviduriai - FSII. Juoda - silpna apšvīta, žalia - normali, raudona - stipri. Apskritimai - 440 nm sužadınimas, trikampiai - 475 nm. Pagal eksperimentines kinetikas, paimtas iš [5] šaltinio.

2 lentelė. Tilakoidų, augintų prie skirtingų apšvītų, FA modelio parametrai. Pagal eksperimentines kinetikas, paimtas iš [5] šaltinio.

Sužadavimo bangos ilgis (nm)	Apšvita	FSI				FSII				τ_{vid} prie 680/700/720 nm (ps)
		d	τ (ns)	τ_{vid} (ps)	Indėlis į kinetiką prie 680/700/720 nm (%)	d	τ (ns)	τ_{vid} (ps)	Indėlis į kinetiką prie 680/700/720 nm (%)	
440	silnpa	2.46	1.51	100	10/34/54	1.89	3.86	327	90/66/46	303/294/203
440	normali	2.38	1.51	103	14/39/54	1.96	2.98	242	86/61/46	222/187/167
475	normali	2.38	1.43	97	1/31/43	2.01	2.86	227	99/69/57	225/187/171
440	stipri	2.37	1.38	94	13/44/59	2.02	2.33	184	87/56/41	172/144/131
475	stipri	2.35	1.39	95	4/28/44	2.03	2.26	177	96/72/56	174/154/141

4.3 Pirma ir antra tilakoido būseną

Esant stipriai apšvitai, tilakoidas pereina į antrą būseną. Būsenos pasikeitimo metu dalis FSII išorinės antenos kompleksų atsikabina. Kai kurie šaltiniai teigia, kad FSI, pereinant į antrą būseną, nekinta [7]. Tuo tarpu kiti šaltiniai teigia, kad dalį LHCII kompleksų prisijungia prie FSI [13] (18 pav.). Taip pat dalis laisvų LHCII trimerų gali susijungti į agregatus. Agregatuose sužadavimo vidutinė gyvavimo trukmė yra apie 400 ps, kas yra daug mažiau nei laisvuose chlorofiluose (2 ns). Kadangi gali susidaryti labai įvairios struktūros agregatų, tai kiekviename iš jų sužadimui reikės nueiti vis kitokį kelią iki agregate esančios gaudyklės. Dėl to ir agregatams turėtų būti galima taikyti FA modelį.



18 pav. Pirma ir antra būsenos tilakoide. Manoma, kad antros būsenos tilakoide laisvi LHCII kompleksai gali sulipti į agregatus. Žali rutuliukai - LHCII, rudi - LHCI. Adaptuotas pagal [13] šaltinio 1 pav.

Aprašinėdami tilakoidus, esančius antroje būsenoje, FA modelį taikėme ne tik FSI-ai ir FSII-ai, bet ir agregatams. Todėl antroje būsenoje esantiems tilakoidams buvo ieškota 9 FA modelio parametrų:

$$F_t = c_1 F_1(d_1, \tau_1) + c_2 F_2(d_2, \tau_2) + (1 - c_1 - c_2) F_a(d_a, \tau_a), \quad (15)$$

čia F_t - tilakoido kinetika; F_1 , F_2 ir F_a - FSI, FSII ir agregatų kinetikos priklausančios nuo FA modelio parametrų τ ir d ; c_1 , c_2 ir c_a - šių kinetikų indėliai į bendrą tilakoido kinetiką. Ieškant šių parametrų buvo padaryta prielaida, kad agregatus atitinka sistema, kurios parametras τ didžiausias. Eksperimentinės kinetikos pateiktos prie trijų detekcijos bangos ilgių (680nm, 700nm ir 720nm). Buvo laikoma, kad prie skirtingų detekcijos bangos ilgių FSI, FSII ir agregatų parametrai turi nesikeisti, o keistis tik koeficientų c_1 , c_2 ir c_a vertės. Taigi, iš viso vienu metu buvo ieškoma 12 parametrų, kurie geriausiai tiktų trims eksperimentinėms kinetikoms aprašyti. Tuo tarpu tiems patiems tilakoidams, esantiems pirmoje būsenoje, buvo ieškoma 9 parametrų taip, kaip buvo aprašyta ankstesniame skyriuje.

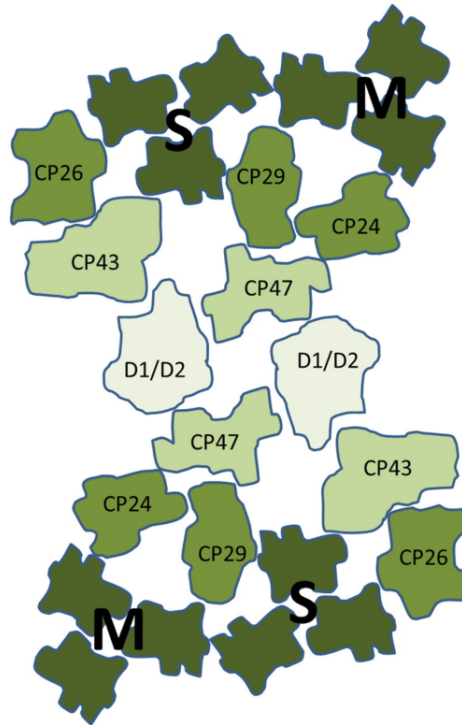
3 lentelė. FA modelio parametrai tilakoido pirmai ir antrai būsenai. Pagal fluorescencijos gesimo kinetikas augalams iš [7] šaltinio.

Su- ža- di- nimas (nm)	FSI								FSII								Agregatai			
	Būsenai I				Būsenai II				Būsenai I				Būsenai II				Būsenai II			
	d	τ (ns)	τ_{vid} (ps)	680 700 720 nm %	d	τ (ns)	τ_{vid} (ps)	680 700 720 nm %	d	τ (ns)	τ_{vid} (ps)	680 700 720 nm %	d	τ (ns)	τ_{vid} (ps)	680 700 720 nm %	d	τ (ns)	τ_{vid} (ps)	680 700 720 nm %
400	2.29	1.19	84	45 65 63	2.75	1.29	79	29 43 50	2.32	8.08	560	55 35 37	2.47	6.57	312	44 46 50	1.50	2.76	435	27 11 0
465	2.29	1.24	87	48 65 64	2.70	1.48	92	36 51 50	2.11	9.44	712	52 35 36	2.31	7.20	376	49 49 50	1.49	3.3	502	15 0 0

Gauti rezultatai rodo, kad agregatų indėlis į fluorescencijos kinetiką antros būsenos tilakoiduose yra apie 10%. Gauti pirmos ir antros būsenos tilakoidų parametrai augalams prie skirtingų žadinimo bangos ilgių pateikti 3 lentelėje. Čia matome, kad pereinant į antrą būseną pirmojoje fotosistemoje FA parametras τ padidėja, kas parodo, kad sistema padidėjo dėl prisijungtų LHCII kompleksų. Dimensijos parametras d taip pat padidėjo, kas parodo didesnę vidutinę sistemos kompleksų koordinaciją. Šie rezultatai sutampa su 3.3 skyriuje gautais rezultatais. Tuo tarpu antroje fotosistemoje FA parametras τ sumažėja, kas atspindi sistemos sumažėjimą dėl išorinių kompleksų praradimo.

4.4 Mutantai tilakoiduose

Buvo tirtos [51] šaltinyje pateiktos tilakoidų su mutantais fluorescencijos gesimo kinetikos. Mutantai buvo gauti genetiškai modifikavus tilakoidus taip, kad jie išaugtų be tam tikrų išorinės antenos kompleksų. 19 pav. pavaizduota FSII-os su išoriniais LHC kompleksais struktūrinė schema. Buvo tirti trijų rūšių mutantai: mutantai be CP26 ir CP24 (KoCP26/24), mutantai be CP29 ir CP24 (KoCP29/24) ir mutantai be CP24, CP26 ir CP29 (NoM). Kompleksai CP24, CP26 ir CP29 yra nedideli ir jungia sistemos branduolį su LHCII trimerais. Mutantai be šių kompleksų buvo auginti su tikslu išsiaiškinti šių kompleksų paskirtį.



19 pav. Struktūrinė FSII augale (*Arabidopsis thaliana*) FS branduolį sudaro reakcijos centras (D1/D2) ir CP47 ir CP43 kompleksai. CP24, CP26 ir CP29 mažosios išorinės antenos kompleksai. (S) ir (M) didieji LHCII kompleksai. Paveikslukas paimtas iš [51] šaltinio.

Šių mutantų FA modelio parametrų verčių palyginimas su natūralaus tilakoido (WT) parametro vertėmis pateiktas 4 lentelėje. [51] šaltinyje išaugusi fluorescencijos gesimo vidutinė trukmė aiškinama suprastėjusia koordinacija tarp kompleksų. Tą FA modelyje turėtų parodyti dimensijos parametras. Tačiau matome, kad dimensijos parametras FSII beveik nekinta, tačiau

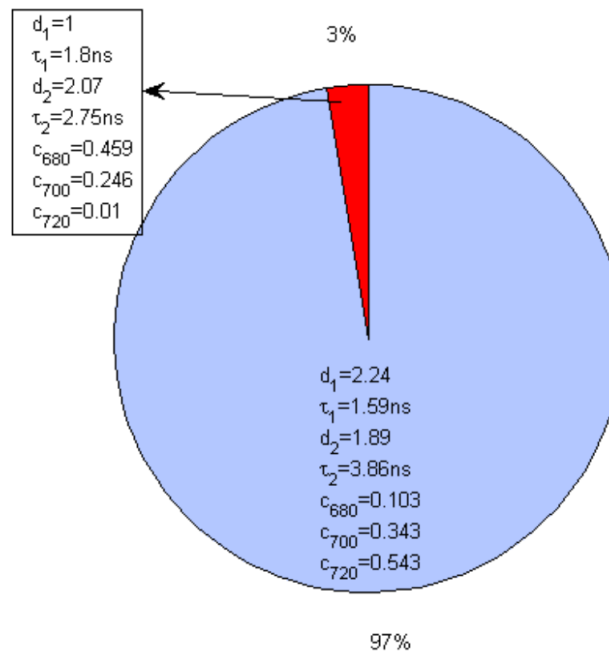
4 lentelė. FA modelio parametrai tilakoidams mutantams. Parametrai suskaičiuoti pagal [51] šaltinyje pateiktas eksperimentines fluorescencijos gesimo kinetikas.

	FSI				FSII				τ_{vid} (ps)
	d	τ (ns)	τ_{vid} (ps)	680 700 720 nm %	d	τ (ns)	τ_{vid} (ps)	680 700 720 nm %	
WT	2.21	1.02	74	43 60 71	2.62	6.01	381	57 40 29	250 197 163
KoCP29/24	2.28	1.23	87	34 53 68	2.65	11.3	709	66 47 32	500 382 286
KoCP26/24	2.25	1.24	88	35 56 60	2.48	13.2	869	65 44 40	599 436 397
NoM	2.16	1.21	89	43 59 70	2.6	15.2	966	57 41 30	588 450 350

labai smarkiai išauga trukmės parametras τ . Tai reiškia, kad FSII be šių kompleksų yra gerokai didesnė. Tai galima aiškinti mutantų aplipimu LHCII trimerais. Tuomet tai reiškia, kad tarpinių kompleksų CP24, CP26 ir CP29 paskirtis yra reguliuoti LHCII trimerų kiekį antrojoje fotosistemoje.

5 Dirbtinių neuroninių tinklų panaudojimas, sprendžiant nevienareikšmiškumo problemą fluktuojančių antenų modelio parametrų paieškos uždavinyje

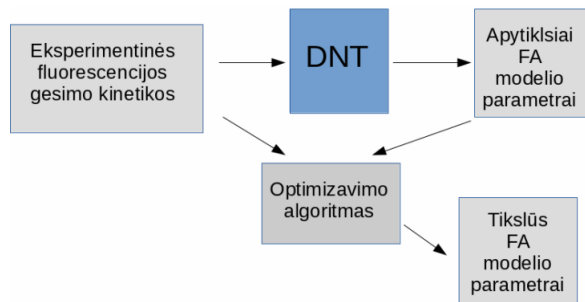
Ieškodami geriausių FA modelio parametrų, aprašančių tilakoidų gesimo kinetikas dėl didelio parametrų skaičiaus (7 parametrai pirmos būsenos ir 12 parametrų antros būsenos tilakoide), neturime tokio vienareikšmiškumo, kaip ieškant modelio parametrų FSI-os ar FSII-os atveju. Tuomet, priklausomai nuo pasirinkto optimizavimo algoritmo, rasti parametrai gali priklausyti nuo pradinių ieškomų parametrų verčių. 20 pav. pavaizduota, kaip ieškant FA modelio parametrų [5] straipsnyje pateiktai kinetikai gaunami du skirtingi sprendiniai, priklausomai nuo pradinės paieškos vietos. Tam tikslui buvo 500 kartų atsitiktinai generuoti pradiniai parametrai. Tuomet pagal patikimosios srities atspindžio algoritmą [24] buvo ieškota optimalių parametrų. 97% atveju buvo gautos *teisingos* parametrų vertės, tačiau 3% atveju algoritmas *suklydo* ir pateikė lokaliame minimume esančią vertę.



20 pav. Patikimosios srities atspindžio algoritmu gautos FA modelio parametrų vertės, aprašančios tilakoido fluorescencijos gesimo kinetiką, paimtą iš [5] šaltinio. Priklausomai nuo pradinių parametrų verčių, pasirenka *teisingą* (97%) arba *klaidingą* (3%) tašką. Diagrama, gauta iš 500-ų atsitiktinai sugeneruotų pradinių sąlygų.

Nevienareikšmiškumo problemai spręsti galima panaudoti dirbtinius neuroninius tinklus (DNT) [52]. DNT-us apmokius iš fluorescencijos gesimo kinetikų rasti FA modelio parametrus, DNT-ų grąžintus parametrus būtų galima naudoti kaip pradines sąlygas paieškos algoritme (21 pav.). Taip pat, jei DNT-us pavyktų apmokyti taip, kad jie grąžintų pakankamai tikslias vertes, jais būtų galima pakeisti optimalių parametrų paieškos algoritmą. Tokiu būdu būtų sutaupoma laiko skaičiavimams, nes apmokyti DNT-ai atsakymą duoda daug kartų greičiau nei, pavyzdžiui, mūsų naudotas patikimosios srities atspindžio algoritmas. [53] darbe buvo nagrinėtas DNT-ų

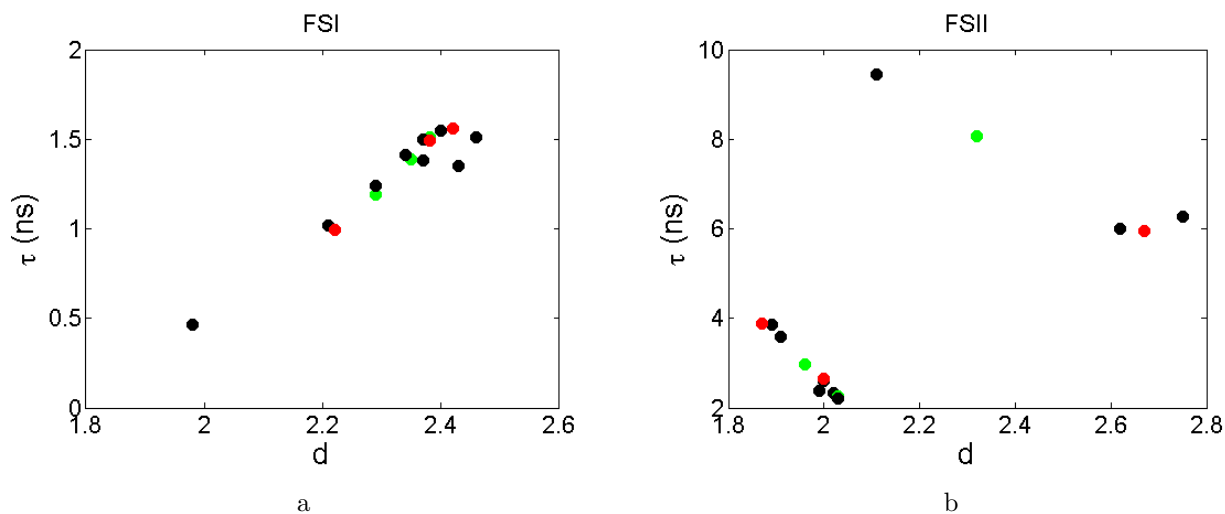
taikymas FA modelio parametru paieškos uždavinyje. DNT veikimo ir mokymo principai yra detalai aprašyti [53] šaltinyje ir šiame darbe yra pateikti priede Nr. 1.



21 pav. DNT panaudojimas FA modelių parametru paieškoje.

Šiame darbe DNT-ai buvo mokyti atpažinti septynis FA modelių parametrus iš tilakoidų fluorescencijos gesimo kinetikų. Į tinklo įėjimą buvo paduodami trijų kinetikų, gautų prie skirtingų detekcijos bangos ilgių, taškai (prie 680nm, 700nm ir 720nm). Iš kiekvienos kinetikos buvo paimta po 10 taškų. Taškai buvo imti pagal (13) formulę, tam, kad ten, kur kinetika kinta sparčiau (pradžioje), būtų paimta daugiau taškų, o ten, kur lėčiau - mažiau. Taigi, iš viso DNT-o įėjimą sudarė 30 taškų. DNT išėjimas grąžindavo 7 parametrus: FA modelio parametrus d ir τ FSI-ai ir FSII-a bei tris koeficientus, nusakančius FSI indėlį į tilakoido fluorescencijos kinetiką, gautą prie skirtingų detekcijos bangos ilgių. DNT-as buvo pasirinktas su dviem paslėptais sluoksniais, turinčiais po penkis neuronus.

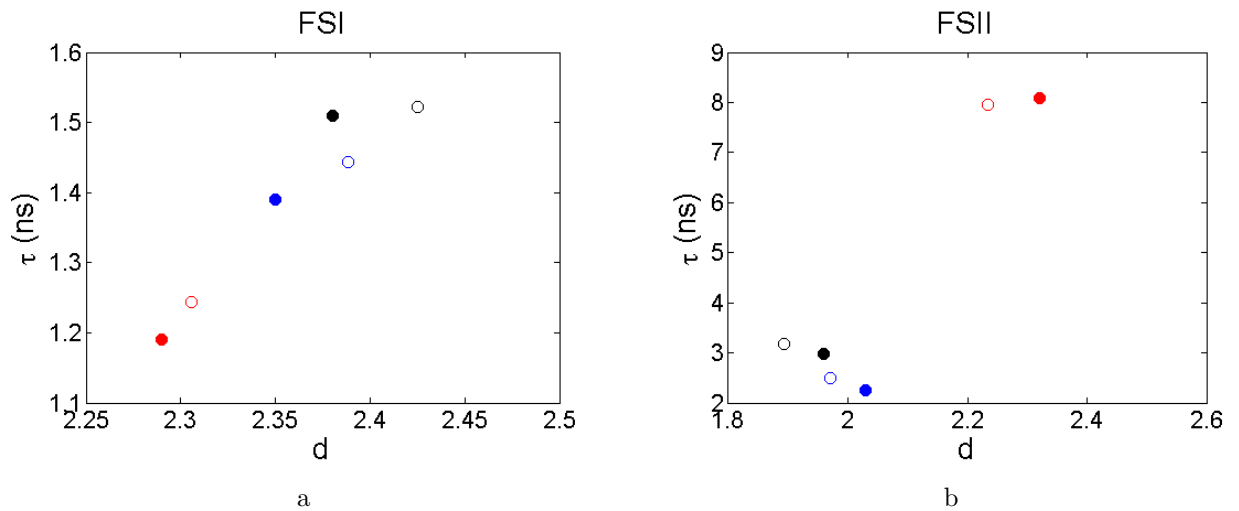
DNT-o apmokymui, validavimui ir testavimui buvo naudota 13 tilakoidų fluorescencijos gesimo kinetikų su anksčiau apskaičiuotais FA modelio parametrais. 7 taškai buvo naudoti mokymui, 3 validavimui ir likę 3 testavimui. Pasirinktų taškų FSI-os ir FSII-os FA modelio parametru projekcijos pavaizduotos 22 pav.



22 pav. DNT-o mokymui, validavimui ir testavimui naudotų taškų projekcijos FSI ir FSII sistemose. Juoda - mokymo duomenys, raudona - validavimo duomenys, žalia - testavimo duomenys. (a) - FSI, (b) - FSII.

DNT-o mokymui buvo naudotas *MATLAB* programavimo paketas su *Neural Networks Toolbox* paprograme. Apmokytas DNT-as buvo testuojamas su 22 pav. pateiktais testavimo

taškais. DNT-o atsakas į testines fluorescencijos gesimo kinetikas pavaizduotas 23 pav. Čia pavaizduotos tinklo atsako projekcijos į FSI ir FSII sistemas. Čia matome, kad, nepaisant labai mažo mokomųjų taškų kiekio, apmokyto DNT-o gražinti taškai yra labai arti tikrųjų FA modelio taškų. Taigi, galime teigti, kad DNT-ą galima taikyti FA modelio parametrų radimui iš fluorescencijos gesimo kinetikų.



23 pav. Apmokyto DNT-o gražintų verčių palyginimas su tikrosiomis vertėmis. Pilnaviduriai apskritimai vaizduoja tikrąsias vertes, o tuščiaviduriai – vertes gražintas DNT-o. Čia pateiktos tinklo atsako projekcijos į FSI ir FSII sistemas. (a) - FSI, (b) - FSII.

Išvados

1. Geras 39 eksperimentinių FSI fluorescencijos gesimo kinetikų sutapimas su FA modelio kinetikomis ir neprieštaringa gautų parametrų interpretacija parodo, kad FA modelis galioja FSI branduoliams bei FSI su išoriniais šviesą sugeriančių antenų kompleksais. Todėl FA modelis gali būti panaudotas tilakoidų fluorescencijos kinetikų modeliavimui.
2. Bakterijų ir augalų fluorescencijos kinetikų palyginimas parodė, kad FSI kompleksai bakterijose turi didesnę vidutinę koordinaciją nei augaluose.
3. FSI-LHCI ir FSI-LHCI-LHCII modelių parametrų palyginimas rodo, kad LHCII kompleksams, prisijungus prie FSI, augaluose kompleksų koordinacija didėja, o dumbliuose mažėja.
4. Nustatyti fotosistemų FA parametrai parodė, kad, pirmojoje tilakoidų būsenoje, esant didesnei ilgalaikei apšvitai, FSII sumažėja ir kompleksai tampa geriau koordinuoti, o FSI dydis ir kompleksų koordinacija nuo apšvitos beveik nepriklauso.
5. Antroje tilakoidų būsenoje dėl LHCII kompleksų migracijos nuo FSII prie FSI, pastaroji padidėja, o FSII sumažėja. Taigi, šiame darbe išspręsta iki šiol skirtinguose šaltiniuose buvusi kolizija, kad FSI nekinta [7] arba, kad FSI prisijungia dalį LHCII kompleksų [13].
6. Palyginus FA modelio parametrus natūraliems tilakoidams ir tilakoidų mutantams be minorinių FSII antenos kompleksų (CP24, CP26, CP29), nustatyta, kad tilakoiduose mutantuose FSII smarkiai padidėja. Tai reiškia, kad šių FSII kompleksų vaidmuo yra FSII struktūros optimizavimas, nes be jų antena tampa labai didelė.
7. DNT-ą apmokius rasti FA modelio parametrus tilakoidams ir išbandžius tai su testiniais duomenimis, nustatyta, kad DNT-as gali būti pritaikytas nevienareikšmiškumo ir spartos problemai spręsti tilakoidų FA modelio parametrų paieškos uždavinyje.

Literatūros sąrašas

- [1] R. E. Blankenship, *Molecular Mechanisms of Photosynthesis* (2002).
- [2] A. Ruban, *The photosynthetic membrane: molecular mechanisms and biophysics of light harvesting* (Oxford, UK: Wiley-Blackwell., 2012).
- [3] F. Muh, T. Renger, *Structure-Based Calculation of Pigment-Protein and Excitonic Pigment-Pigment Coupling in Photosynthetic Light-Harvesting Complexes. In: The Biophysics of Photosynthesis, J. Golbeck, A. van der Est Ed.* (Springer Science+Business Media, New York, 2014, pp. 3-44).
- [4] J.-D. Rochaix, Regulation and dynamics of the light-harvesting system, *Annu. Rev. Plant Biol.* **65**(1), 287–309, PMID: 24471838 (2014).
- [5] E. Wientjes, H. van Amerongen, R. Croce, Quantum yield of charge separation in photosystem II: Functional effect of changes in the antenna size upon light acclimation, *J. Phys. Chem. B* **117**(38), 11200–8 (2013).
- [6] J. Minagawa, State transitions—the molecular remodeling of photosynthetic supercomplexes that controls energy flow in the chloroplast, *BBA - Bioenergetics* **1807**(8), 897–905 (2011).
- [7] C. Ünlü, B. Drop, R. Croce, H. van Amerongen, State transitions in *Chlamydomonas reinhardtii* strongly modulate the functional size of photosystem II but not of photosystem I, *PNAS* **111**, 3460–5 (2014).
- [8] G. Nagy, R. Ünneper, O. Zsiros, R. Tokutsu, K. Takizawa, L. Porcar, L. Moyet, D. Petroustos, G. Garab, G. Finazzi, et al., Chloroplast remodeling during state transitions in *chlamydomonas reinhardtii* as revealed by noninvasive techniques in vivo, *PNAS* **111**(13), 5042–7 (2014).
- [9] R. Delosme, J. Olive, F.-A. Wollman, Changes in light energy distribution upon state transitions: an in vivo photoacoustic study of the wild type and photosynthesis mutants from *Chlamydomonas reinhardtii*, *BBA - Bioenergetics* **1273**(2), 150–8 (1996).
- [10] J. Chmeliov, G. Trinkunas, H. van Amerongen, L. Valkunas, Light harvesting in a fluctuating antenna, *JACS* **136**(25), 8963–72 (2014).
- [11] J. Chmeliov, G. Trinkunas, H. van Amerongen, L. Valkunas, Excitation migration in fluctuating light-harvesting antenna systems, *Photosynth. Res.* **127**, 49–60 (2016).
- [12] S. Farooq, J. Chmeliov, G. Trinkunas, L. Valkunas, H. van Amerongen, Is there excitation energy transfer between different layers of stacked photosystem-ii-containing thylakoid membranes?, *J. Phys. Chem. Lett.* **7**, 1406–10 (2016).
- [13] M. Goldschmidt-Clermont, R. Bassi, Sharing light between two photosystems: mechanism of state transitions, *Curr. Opin. Plant Biol.* **25**, 71–8 (2015).
- [14] K. Broess, G. Trinkunas, C. D. van der Weij-de Wit, J. P. Dekker, A. van Hoek, H. van Amerongen, Excitation energy transfer and charge separation in photosystem II membranes revisited, *Biophys. J.* **91**(10), 3776 – 3786 (2006).

- [15] Y. Miloslavina, M. Szczepaniak, M. G. Mueller, J. Sander, M. Nowaczyk, M. Roegner, A. R. Holzwarth, Charge separation kinetics in intact photosystem II core particles is trap-limited. a picosecond fluorescence study, *Biochemistry* **45**, 2436–42 (2006).
- [16] H. van Amerongen, R. Croce, Light harvesting in photosystem II, *Photosynth. Res.* **116**(2-3), 251–263 (2013).
- [17] A. Krieger-liszkay, Singlet oxygen production in photosynthesis, *J. Exp. Bot.* (2004).
- [18] J. Veerman, M. D. McConnell, S. Vasil’ev, F. Mamedov, S. Styring, D. Bruce, Functional heterogeneity of photosystem II in domain specific regions of the thylakoid membrane of spinach (*spinacia oleracea* l.), *Biochem.* **46**, 3443–53 (2007).
- [19] I. Vass, G. Gatzzen, A. R. Holzwarth, Picosecond time-resolved fluorescence studies on photoinhibition and double reduction of Q_A in photosystem II, *BBA - Bioenergetics* **1183**, 388–96 (1993).
- [20] L. Barter, M. Schilstra, J. Barber, J. Durrant, D. Klug, Are the trapping dynamics in photosystem II sensitive to Q_A redox potential?, *J. Photoch. Photobio. A* **142**, 127–132 (2001).
- [21] S. Caffarri, K. Broess, R. Croce, H. van Amerongen, Excitation energy transfer and trapping in higher plant photosystem II complexes with different antenna sizes, *Biophys. J.* **100**(9), 2094–2103 (2011).
- [22] K. Broess, G. Trinkunas, A. van Hoek, R. Croce, H. van Amerongen, Determination of the excitation migration time in photosystem II consequences for the membrane organization and charge separation parameters, *BBA - Bioenergetics* **177**, 404–9 (2008).
- [23] E. Belgio, M. Johnson, S. Jurić, A. Ruban, Higher plant photosystem II light-harvesting antenna, not the reaction center, determines the excited-state lifetime—both the maximum and the nonphotochemically quenched, *Biophys. J.* **102**, 2761–71 (2012).
- [24] R. H. Byrd, R. B. Schnabel, G. A. Shultz, A trust region algorithm for nonlinearly constrained optimization, *J. Numer. Anal.* **24**, 1152–70 (1986).
- [25] N. Nelson, Plant photosystem I: the most efficient nano-photochemical machine, *J. Nanosci. Nanotechnol.* **3**, 1709–13 (2009).
- [26] S. Vaitekonis, G. Trinkunas, L. Valkunas, Red chlorophylls in the exciton model of photosystem I, *Photosynth. Res.* **86**, 185–201 (2005).
- [27] R. Croce, H. van Amerongen, Light-harvesting in photosystem I, *Photosynth. Res.* **116**(2-3), 153–166 (2013).
- [28] M. Du, X. Xie, Y. Jia, L. Mets, G. R. Fleming, Direct observation of ultrafast energy transfer in psi core antenna, *Chem. Phys. Lett.* **201**(5), 535–42 (1993).
- [29] N. V. Karapetyan, Y. V. Bolychevtseva, N. P. Yurina, I. V. Terekhova, V. V. Shubin, M. Brecht, Long-wavelength chlorophylls in photosystem I of cyanobacteria: Origin, localization, and functions, *Biochem. (Mosc)* **79**(3), 213–20 (2014).

- [30] B. Gobets, I. H. van Stokkum, M. Rögner, J. Kruip, E. S. and N V Karapetyan, J. P. Dekker, R. van Grondelle, Time-resolved fluorescence emission measurements of photosystem I particles of various cyanobacteria: a unified compartmental model, *Biophys J* **81**, 407–424 (2001).
- [31] R. C. Jennings, G. Zucchelli, S. Santabarbara, Photochemical trapping heterogeneity as a function of wavelength, in plant photosystem I (PSI-LHCI), *BBA - Bioenergetics* **1827**(6), 779 – 785 (2013).
- [32] M. Ballottari, M. J. P. Alcocer, C. D’Andrea, D. Viola, T. K. Ahn, A. Petrosza, D. Polli, G. R. Fleming, G. Cerullo, R. Bassi, Regulation of photosystem I light harvesting by zeaxanthin, *PNAS* **111**(23), E2431–E2438 (2014).
- [33] B. van Oort, A. Amunts, J. W. Borst, A. van Hoek, N. Nelson, H. van Amerongen, R. Croce, Picosecond fluorescence of intact and dissolved PSI-LHCI crystals, *Biophys. J.* **95**(12), 5851–61 (2008).
- [34] E. Wientjes, I. van Stokkum, H. van Amerongen, R. Croce, The role of the individual lhcas in photosystem I excitation energy trapping, *Biophys. J.* **101**(3), 745–754 (2011).
- [35] C. Slavov, M. Ballottari, T. Morosinotto, R. Bassi, A. R. Holzwarth, Trap-limited charge separation kinetics in higher plant photosystem I complexes, *Biophys J* **94**(9), 3601–12 (2008).
- [36] R. Croce, D. Dorra, A. R. Holzwarth, R. C. Jennings, Fluorescence decay and spectral evolution in intact photosystem I of higher plants, *Biochemistry* **39**, 6341–8 (2000).
- [37] E. Engelmann, G. Zucchelli, A. P. Casazza, D. Brogioli, F. M. Garlaschi, R. C. Jennings, Influence of the photosystem I-light harvesting complex I antenna domains on fluorescence decay, *Biochemistry* **45**, 6947–55 (2006).
- [38] P. Galka, S. Santabarbara, T. Khuong, H. Degand, P. Morsomme, R. Jennings, E. Boekema, S. Caffarri, Functional analyses of the plant photosystem I-light-harvesting complex II supercomplex reveal that light-harvesting complex II loosely bound to photosystem II is a very efficient antenna for photosystem I in state II, *Plant Cell* **24**(5), 2963–78 (2012).
- [39] P. Akhtar, M. Lingvay, T. Kiss, R. Deák, A. Bóta, B. Ughy, G. Garab, P. H. Lambrev, Excitation energy transfer between light-harvesting complex II and photosystem I in reconstituted membranes, *BBA - Bioenergetics* **1857**, 462–72 (2016).
- [40] E. Wientjes, H. van Amerongen, R. Croce, LHCII is an antenna of both photosystems after long-term acclimation, *BBA - Bioenergetics* **1827**(3), 420–6 (2013).
- [41] N. V. Karapetyan, D. Dorra, G. Schweitzer, I. N. Bezmertnaya, A. R. Holzwarth, Fluorescence spectroscopy of the longwave chlorophylls in trimeric and monomeric photosystem I core complexes from the cyanobacterium *spirulina platensis*, *Biochemistry* **36**, 13830–7 (1997).
- [42] E. G. Andrizhiyevskaya, D. Frolov, R. van Grondelle, J. P. Dekker, Energy transfer and trapping in the photosystem I complex of *synechococcus* {PCC} 7942 and in its supercomplex with IsiA, *BBA - Bioenergetics* **1656**(2–3), 104 – 113 (2004).

- [43] S. Turconi, N. Weber, G. Schweitzer, H. Strotmann, A. R. Holzwarth, Energy transfer and charge separation kinetics in photosystem I. 2. picosecond fluorescence study of various PS I particles and light-harvesting complex isolated from higher plants, *BBA - Bioenergetics* **1187**, 324–34.
- [44] B. Gobets, I. H. van Stokkum, F. van Mourik, J. P. Dekker, R. van Grondelle, Excitation wavelength dependence of the fluorescence kinetics in photosystem I particles from *synechocystis* {PCC} 6803 and *synechococcus elongatus*, *Biophys. J.* **85**(6), 3883–98 (2003).
- [45] J. N. Alfred R. Holzwarth, Marc G. Muller, W. Lubitz, Charge recombination fluorescence in photosystem I reaction centers from *chlamydomonas reinhardtii*, *J. Phys. Chem. B* **109**, 5903–11 (2005).
- [46] S. Turconi, J. Kruij, G. Schweitzer, M. Rogner, A. R. Holzwarth, A comparative fluorescence kinetics study of photosystem I monomers and trimers from *synechocystis pcc 6803*, *Photosynth. Res.* **49**, 263–8.
- [47] C. L. Quiniou, L. Tian, B. Drop, E. Wientjes, I. H. van Stokkum, B. van Oort, R. Croce, PSI-LHCI of *chlamydomonas reinhardtii*: Increasing the absorption cross section without losing efficiency, *BBA - Bioenergetics* **1847**(4–5), 458–67 (2015).
- [48] C. L. Quiniou, B. van Oort, B. Drop, I. H. M. van Stokkum, , R. Croce, The high efficiency of photosystem I in the green alga *chlamydomonas reinhardtii* is maintained after the antenna size is substantially increased by the association of light-harvesting complexes II, *J. Biol. Chem.* **290**, 30587–95 (2015).
- [49] C. L. Quiniou, *How do size, composition and supramolecular organization influence the Photosystem I trapping efficiency?*, Ph.D. thesis, From the Department of Physics and Astronomy, Faculty of Sciences, VU University Amsterdam and Institute for Lasers, Life and Biophotonics Amsterdam, LaserLaB Amsterdam, De Boelelaan 1081, 1081 HV Amsterdam, The Netherlands (2016).
- [50] P. Jordan, P. Fromme, H. T. Witt, O. Klukas, W. Saenger, N. Krauss, Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution, *Nature* **411**, 909–17 (2001).
- [51] S. Dall’Osto, S. Ünlü, S. Cazzaniga, H. van Amerongen, Disturbed excitation energy transfer in *Arabidopsis thaliana* mutants lacking minor antenna complexes of photosystem II, *BBA - Bioenergetics* **1837**, 1981–8 (2014).
- [52] M. Lilichenko, A. M. Kelley, Application of artificial neural networks and genetic algorithms to modeling molecular electronic spectra in solution, *J. Chem. Phys.* **114**(16), 7094 (2001).
- [53] T. Babelis, *Dirbtinių neuroninių tinklų taikymas fotosintetinių šviesą surenkančių antenų sandaros vertinimams*, Magistratūros studijų mokslo tiriamasis darbas, VU (2016).
- [54] V. M. Krasnopolsky, *The Application of Neural Networks in the Earth System Sciences: Neural Network Emulations for Complex Multidimensional Mappings* (Springer Publishing Company, Incorporated, 2013).
- [55] V. N. Vapnik, *The Nature of Statistical Learning Theory* (Springer-Verlag New York, Inc., New York, NY, USA, 1995).

- [56] B. Jiang, H. Guo, Permutation invariant polynomial neural network approach to fitting potential energy surfaces, *J. Chem. Phys.* **139**(3), 054112 (2013).
- [57] J. Behler, Representing potential energy surfaces by high-dimensional neural network potentials, *J. Phys. Condens. Matter.* **26**(18), 183001 (2014).
- [58] P. Nazarov, V. Apanasovich, V. Lutkovski, M. Yatskou, R. Koehorst, M. Hemminga, Artificial neural network modification of simulation-based fitting: Application to a protein-lipid system, *J. Chem. Inf. Model* **44**(2), 568–74 (2004).
- [59] G. Cybenko, Approximation by superpositions of a sigmoidal function, *Math. Control Signal* **2**, 303–314 (1989).
- [60] K. Hornik, Approximation capabilities of multilayer feedforward networks, *Neural Netw.* **4**(2), 251–7 (1991).
- [61] T. Chen, A unified approach for neural network-like approximation of non-linear functionals, *Neural Netw.* **11**, 981–983 (1998).
- [62] J. D. I. Bogdan M. Wilamowski, *Intelligent Systems* (CRC Press, 2011).
- [63] C. M. Bishop, *Pattern Recognition and Machine Learning (Information Science and Statistics)* (Springer-Verlag New York, Inc., Secaucus, NJ, USA, 2006).

RECOGNITION OF LIGHT HARVESTING ANTENNA ALTERATION IN THYLAKOIDS

Summary

The energy of light is necessary for the life on Earth. Organisms that have used the energy of light throughout the ages of evolution have created a complex process of photosynthesis – a process of light absorption and transformation to chemical energy. The first stages of the process of photosynthesis take place in photosystems located inside the thylakoid. However, how the light energy is efficiently harvested and transferred to reaction centres of photosystems is still under debate. The recently proposed fluctuating antenna model that takes into account the structural dynamics of light harvesting antenna has successfully resolved the remaining controversies about the non-exponential fluorescence decay kinetics in Photosystem II. This model describes the process of excitation transfer to the reaction centre with only two parameters which provide information about the system size and the coordination of light harvesting complexes. In this study we have shown that non-exponential fluorescence decay kinetics of Photosystem I can also be described by the fluctuating antenna model. With the models of Photosystems I and II at hand, we were able to analyze the dynamics of thylakoids under different acclimation conditions and to address the questions that are still open about the adaptation of photosystems. By modeling the fluorescence decays of thylakoids in the first state we provide evidence that Photosystem I remains almost unchanged, while in the second state under very strong light a few external antenna complexes of Photosystem II migrate to Photosystem I. Particularly, the analysis of the thylakoid mutants lacking the minor light harvesting complexes of Photosystem II indicated that these complexes are responsible for regulation of the external antenna size. The Photosystem II without the minor complexes becomes enormously large. Finally, we have shown that artificial neural network models can be successfully applied to a more effective search for parameters of fluctuating antenna models.

Priedas Nr. 1.

Dirbtiniai neuroniniai tinklai

Dirbtinis neuroninis tinklas (DNT) yra matematinis modelis, paremtas biologinio neuroninio tinklo struktūra ir savybėmis. DNT yra sudarytas iš tarpusavyje sujungtų *neuronų*, kurie vienas kitam perdavinėja signalą. Jungtys tarp neuronų turi svorinius signalo perdavimo koeficientus, kurie nusistovi tinklo apmokymo metu. DNT skirtas realizuoti sudėtingam, netiesiškam, daugelio kintamųjų atvaizdžiui (angl. - *mapping*) [54]. Atvaizdį tarp įėjimo vektoriaus X ir išėjimo vektoriaus Y pažymėkime M . Tuomet:

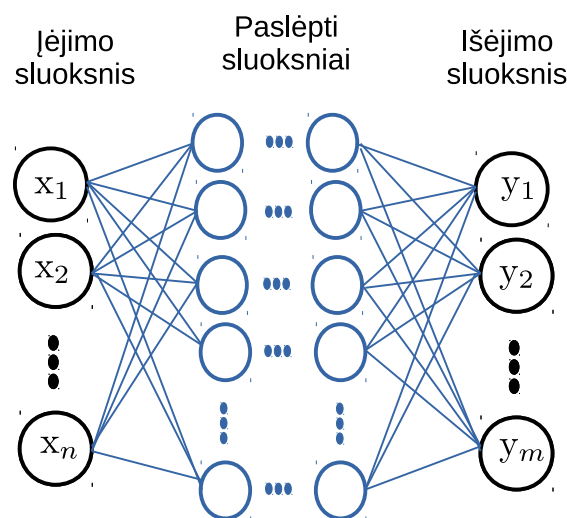
$$Y = M(X); \quad X \in \mathfrak{R}^n, \quad Y \in \mathfrak{R}^m, \quad (16)$$

čia n ir m yra įėjimo ir išėjimo parametrų erdvės dimensija. Daugumą fizikinių uždavinių galima suvesti į nežinomų kintamųjų atvaizdavimą žinomais. Tačiau šis atvaizdavimas dažnai būna sudėtingas ir netiesinis, o tuomet jo analitinės išraiškos nustatyti neįmanoma. Tačiau turint empirinių duomenų, galima apmokyti DNT ir tuomet tinklas galės aproksimuoti įėjimo ir išėjimo parametrų atvaizdį. DNT veikia kaip *juodoji dėžė* – padavus įėjimo vektorius tinklas grąžina išėjimo, tačiau nieko nenumano apie fizikinę priežastį, siejančią šiuos du vektorius.

Naudinga DNT savybė yra ta, kad jis sugeba interpoliuoti, t.y. numatyti išėjimo parametą su tokiais įėjimo vertėmis, kuriomis nebuvo apmokytas, tačiau kurios yra tarpe tarp apmokymo duomenų. Ekstrapoliuoti, t.y. rasti teisingas išėjimo vertes, kurios nėra tarpe tarp apmokymo duomenų, DNT bendru atveju nesugeba [55].

Taip pat DNT gali pakeisti fizikinio uždavinio kompiuterinį modeliavimą [56–58]. Jei uždavinio modelis reikalauja ilgų kompiuterinių skaičiavimų, tuomet apsimoka šio modelio išmokyti DNT. Kadangi DNT veikia greitai, tuomet vėliau sutaupoma laiko ieškant sąryšio tarp modelio parametrų.

Daugiasluoksnis perceptronas DNT klasifikuojami pagal neuronų išsidėstymą ir signalo sklidimo kryptį. DNT neuronai dažniausiai būna išsidėstę sluoksniais, o signalas gali sklirti viena kryptimi arba būti su grįžtamoju ryšiu. Pats populiariausias DNT modelis yra daugiasluoksnis ir be grįžtamojo ryšio. Toks DNT vadinamas *daugiasluoksnio perceptronu* (DSP) (angl. - *multilayer perceptron*).



24 pav. Daugiasluoksnio perceptrono schema.

DSP struktūrinė schema pavaizduota 24 pav. Ją sudaro 3 dalys:

Įėjimo sluoksnis. Į jį paduodamas įėjimo vektorius. Sluoksnyje esančių neuronų skaičius lygus įėjimo parametru skaičiui. Iš šio sluoksnio signalas perduodamas į paslėptuosius sluoksnius.

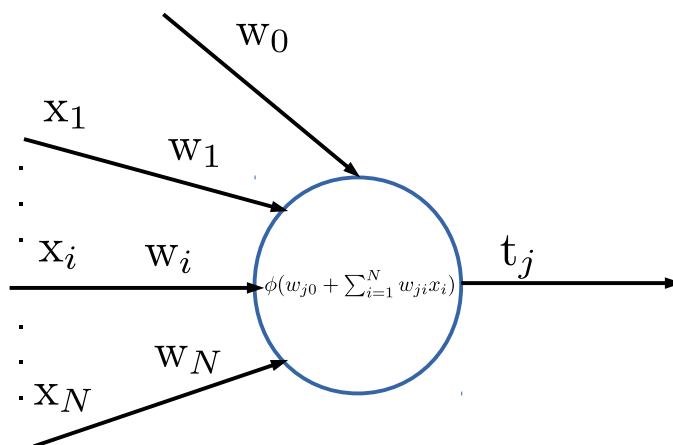
Paslėpti sluoksniai. Nuo paslėptų sluoksnių skaičiaus bei neuronų skaičiaus sluoksniuose parinkimo priklauso, kaip gerai veiks tinklas. Tinklas, turintis daugiau paslėptų sluoksnių, gebės išspręsti sudėtingesnes, netiesines problemas, tačiau tokiame tinklui apmokyti reikės daugiau duomenų. Nėra aiškių kriterijų optimaliam paslėptų sluoksnių ir neuronų skaičiui parinkti ir tai dažnai tenka daryti empiriškai. Praėjęs paslėptus sluoksnius, signalas keliauja į išėjimo sluoksnį.

Išėjimo sluoksnis. DSP grąžina išėjimo parametrų vertes. Sluoksnyje esančių neuronų skaičius yra lygus išėjimo parametrų skaičiui.

25 pav. pavaizduotas atskiras DSP neuronas. DSP kiekvienas neuronas yra sujungtas su visais prieš tai buvusio sluoksnio neuronais. Kiekvieną gautą signalą t_i neuronas padaugina iš jungties svorio w_i ir susumuoja. Tuomet prie šios sumos dar prideda slenkstinę vertę w_0 ir gautą sumą perduoda aktyvavimo funkcijai ϕ . Aktyvavimo funkcijos reikšmė patenka į neurono išėjimą ir perduodama į visus kito sluoksnio neuronus. Neuronų aktyvavimo funkcija dažniausiai būna laiptinė, tiesinė arba sigmoidinė. Šiame darbe naudota sigmoidinė aktyvavimo funkcija:

$$\phi(s) = \frac{1}{1 + e^{-\beta s}}, \quad (17)$$

čia β - posvyrio parametras.



25 pav. Vienas DNT neuronas.

Perceptrono su vienu paslėptu sluoksniu išėjimo vektoriaus komponentę galima užrašyti kaip sumą:

$$y_q = w_{q0}^{(2)} + \sum_{j=1}^k w_{qj}^{(2)} t_j; \quad q = 1, 2, \dots, m, \quad (18)$$

čia:

$$t_j = \phi(w_{j0}^{(1)} + \sum_{i=1}^n w_{ji}^{(1)} x_i), \quad (19)$$

čia x_i ir y_q yra atitinkamai įėjimo ir išėjimo vektorių komponentės; w - DNT jungčių svoriai; n ir m įėjimo ir išėjimo parametrų skaičius; k - paslėptų neuronų skaičius; ϕ - neurono aktyvavimo funkcija. Yra parodyta, kad (18) ir (19) funkcijos gali aproksimuoti bet kokią tolygų vektorių atvaizdį, o aproksimacijos tikslumas yra proporcingas paslėptų neuronų skaičiui k [59–61].

Dirbtinių neuroninių tinklų mokymas Tam, kad DNT galėtų spręsti konkrečią problemą, reikia jį apmokyti mokomaisiais įėjimo/išėjimo duomenų rinkiniais. Tam yra prikurta daugybė DNT mokymo algoritmų. Vienas seniausių ir populiariausių yra *klaidos sklidimo atgal* (KSA) (angl. - *error back-propagation*) algoritmas, kuris paremtas nuostolių funkcijos minimumo paieška. Nuostolių funkcija apibrėžiama taip:

$$E(x, w) = \frac{1}{2} \sum_{p=1}^P \sum_{m=1}^M e_{p,m}^2, \quad (20)$$

čia x - įėjimo vektorius, w - jungčių svorių vektorius, $e_{p,m}$ - skirtumas tarp tinklo išėjimo vertės ir vertės, kurios buvo tikėtasi. Tam, kad rastų minimalią nuostolių funkciją, šis algoritmas skaičiuoja pirmąją funkcijos išvestinę:

$$g = \frac{\partial E(x, w)}{\partial w} = \left[\frac{\partial E}{\partial w_1} \quad \frac{\partial E}{\partial w_2} \quad \dots \quad \frac{\partial E}{\partial w_N} \right]^T \quad (21)$$

Tada jungčių svoriai pakeičiami pagal formulę:

$$w_{k+1} = w_k - \alpha g_k, \quad (22)$$

čia α mokymosi konstanta (žingsnio dydis). Kiekvienos iteracijos metu neuronų jungčių svoriai pakoreguojami taip, kad nuostolių funkcija taptų mažesnė. Mokymosi metu šis algoritmas galiausiai konverguoja, tačiau tam, kad neprašotų funkcijos minimumo, mokymosi konstantą α reikia parinkti gana mažą ir dėl to šis algoritmas pasidaro lėtas.

Daug greitesnis yra *Gauss-Newton* (GN) algoritmas, kuris remiasi tuo, kad gradiento komponentės g_1, g_2, \dots, g_N yra jungčių svorių funkcijos, o jungčių svoriai tarpusavyje nepriklausomi:

$$\begin{cases} g_1 = F_1(w_1, w_2 \dots w_N) \\ g_2 = F_2(w_1, w_2 \dots w_N) \\ \dots \dots \dots \\ g_N = F_N(w_1, w_2 \dots w_N) \end{cases}$$

Jungčių svoriai perskaičiuojami pagal formulę:

$$w_{k+1} = w_k - (J_k^T J_k)^{-1} J_k e_k, \quad (23)$$

Čia J yra *Jakobiano* matrica:

$$J = \begin{pmatrix} \frac{\partial e_{1,1}}{\partial w_1} & \frac{\partial e_{1,1}}{\partial w_2} & \dots & \frac{\partial e_{1,1}}{\partial w_N} \\ \vdots & \vdots & \dots & \vdots \\ \frac{\partial e_{1,M}}{\partial w_1} & \frac{\partial e_{1,M}}{\partial w_2} & \dots & \frac{\partial e_{1,M}}{\partial w_N} \\ \vdots & \vdots & \dots & \vdots \\ \frac{\partial e_{p,1}}{\partial w_1} & \frac{\partial e_{p,1}}{\partial w_2} & \dots & \frac{\partial e_{p,1}}{\partial w_N} \\ \vdots & \vdots & \dots & \vdots \\ \frac{\partial e_{p,M}}{\partial w_1} & \frac{\partial e_{p,M}}{\partial w_2} & \dots & \frac{\partial e_{p,M}}{\partial w_N} \end{pmatrix} \quad (24)$$

GN algoritmas yra daug greitesnis nei KSA algoritmas, tačiau jis nėra stabilus, t.y. nevisada konverguoja.

Šiame darbe buvo naudotas KSA ir GN algoritmų mišinys - *Levenberg-Marquardt* (LM) algoritmas. LM

algoritmas ryšių koeficientus skaičiuoja pagal formulę:

$$w_{k+1} = w_k - (J_k^T J_k + \mu I)^{-1} J_k e_k, \quad (25)$$

čia I - vienetinė matrica, μ yra kombinacijos koeficientas (visada teigiamas). Šis algoritmas apjungia KSA ir GN algoritmus. Kai μ mažas (25) lygis virsta (23) lygtimi (LM virsta GN algoritmu), o kai μ didelis tuomet virsta (22) lygtimi (LM virsta KSA algoritmu). LM algoritmas atlieka tokius žingsnius:

1. DNT sugeneruojami atsitiktiniai jungčių svoriai. Mokomiesiems duomenims apskaičiuojama nuostolių funkcija (20).
2. Jungčių svoriai perskaičiuojami pagal (25) formulę.
3. Tuomet nuostolių funkcija skaičiuojama su naujais jungčių svoriais.
4. Jei nuostolių funkcija padidėjo, tuomet grąžinamos prieš tai buvusios jungčių svorių vertės, o kombinacijos koeficientas μ truputi padidinamas (pvz. 10 kartų). Grįžtama į 2 punktą.
5. Jei nuostolių funkcija sumažėjo, tuomet paliekami nauji jungčių svoriai ir kombinacijos koeficientas μ kažkiek sumažinamas (pvz. 10 kartų).
6. Jei nuostolių funkcija vis dar didesnė už norimą tikslumą, tuomet grįžtama į 2 punktą.

LM algoritmas yra daug greitesnis už KSA ir daug stabilesnis, lyginant su GN. Algoritmas ypač tinka mažiems ir vidutinio dydžio DNT apmokyti. Detalesnį LM algoritmo aprašymą galima rasti šiame šaltinyje [62].

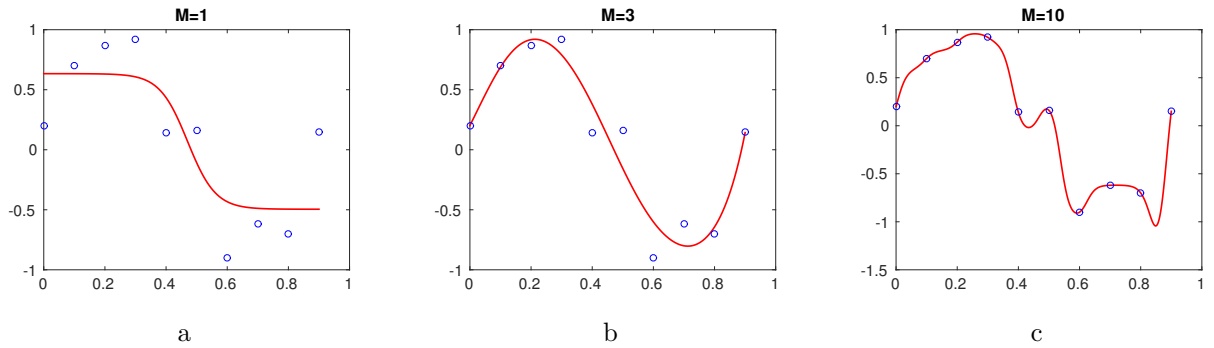
DNT galima mokyti dvejopai. Vienas būdas yra tinklo jungčių svorius keisti po kiekvieno mokymo duomenų vektoriaus perdavimo tinklui. Toks mokymas vadinamas nuosekliu (angl. *online*). Kitas būdas yra pirma perleisti per tinklą visus mokomuosius duomenis ir suskaičiuoti suminę nuostolių funkciją ir tik tuomet keisti jungčių svorius. Toks mokymas vadinamas totaliniu (angl. *batch*). Viena iteracija, kurios metu DNT apmokomas su visais duomenimis, yra vadinama epocha. Totalinis mokymas yra efektyvesnis už nuoseklųjį, tačiau nuoseklaus mokymo plusas yra tai, kad turint didelį mokomųjų duomenų kiekį, priešingai nei totalinio mokymo atveju, nereikia laukti, kol visi duomenys bus perleisti per tinklą. Šiame darbe naudotas totalinis mokymo metodas.

Didesnis DNT-e esantis paslėptų neuronų skaičius leidžia aprašyti sudėtingesnę problemą, tačiau, turint per daug neuronų, tinklą galima permokyti (angl. *over-fitting*) [63]. Kita vertus, jei paslėptų neuronų skaičius per mažas, tai toks tinklas nesugebės išspręsti sudėtingo uždavinio. 26 pav. pateiktas pavyzdys DSP su skirtingais paslėptų neuronų skaičiais, aproksimuojančio vieno kintamojo funkciją. Kadangi dažnai sunku parinkti optimalią tinklo architektūrą, todėl, norint išvengti permokymo, reikia prižiūrėti tinklo mokymo procesą.

Tam, kad būtų išvengta DNT permokymo, mokomųjų duomenų rinkinys dažnai skirstomas į mokymo, validavimo ir testavimo. Mokymo dalis yra skirta tinklo apmokymui ir pagal šiuos duomenis keičiami jungčių svoriai. Validavimo dalis yra skirta prižiūrėti mokymosi procesą tam, kad būtų išvengta tinklo permokymo. Mokymo proceso metu kiekvienos epochos pabaigoje apskaičiuojama vidutinė kvadratinė paklaida (VKP) (arba koks nors kitas statistinį nukrypimą apibūdinantis dydis) tarp tinklo gautų išėjimo verčių ir verčių, esančių mokymo duomenyse

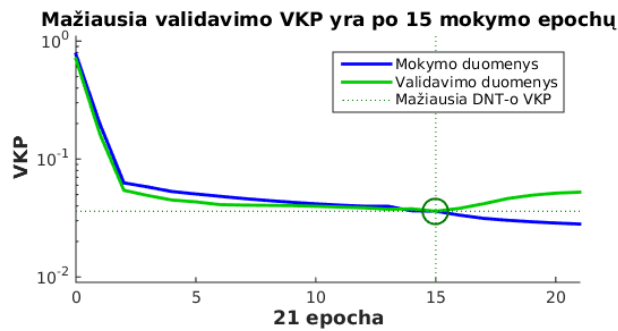
$$\text{VKP} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (\hat{Y}_i - Y_i)^2. \quad (26)$$

Tuomet tinklui paduodami validavimo duomenys ir suskaičiuojama VKP su šiais duomenimis. Mokymo pradžioje VKP turėtų mažėti tiek su mokymo, tiek su validavimo duomenimis. Tinklui pradendant persimokyti, mokomųjų duomenų VKP toliau mažėja, validavimo duomenų VKP pradeda kilti (27 pav.). Tuomet tinklo mokymas stabdomas ir grįžtama prie tinklo, kurio validavimo VKP buvo mažiausias. Šis metodas vadinamas



26 pav. Neuroniniai tinklai su skirtingais paslėptų neuronų skaičiais M , aproksimuojantys vieno kintamojo funkciją: (a) $M=1$. Per mažas neuronų skaičius, kad tinklas būtų pakankamai išmokytas, (b) $M=3$, (c) $M=10$. Paslėptų neuronų per daug ir tinklas yra permokytas.

ankstyvojo sustabdymo metodu (angl. *early stopping*) [63]. Testinių duomenų dalis tinklo mokymo procese nedalyvauja, tačiau jos VPK kitimas turėtų būti panašus į validavimo duomenų. Jei VPK su testiniais ir validavimo duomenimis kinta skirtingai, tai reiškia, kad duomenys suskirstyti nekorektiškai.



27 pav. Vidutinio kvadratinio nuokrypio kitimas mokymo ir validavimo duomenyse.