

**Szegedi Biológiai Kutatóközpont
Növénybiológiai Intézet**



Lambrev Petar

**A II. fénybegyűjtő komplex szerepe
a gerjesztési energia áramlásának
szabályozásában**

Doktori értekezés tézisei

Szeged, 2022

Köszönettel tartozok Lingvay Mónikának, Sipka Gábornak és Magyar Melindának a szöveg angol–magyar fordításában nyújtott segítségükért.

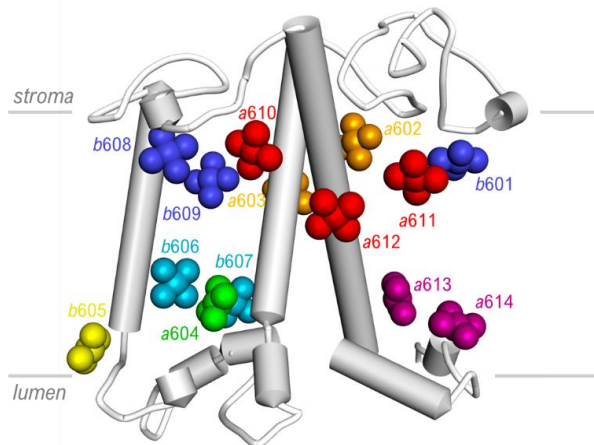
1. TUDOMÁNYOS HÁTTÉR

A Földön, alapvetően, szinte minden életet a fotoszintézis folyamata által tárolt napenergia tart fenn. A fotoszintézis kutatásának fokozása logikus és szükséges lépés az emberiség előtt álló komoly kihívások leküzdéséhez – az egyre növekvő élelmiszer- és energiaigény kielégítéséhez, és ezzel egyidejűleg a szén-dioxid és más üvegházhatású gázok kibocsátásának csökkentéséhez. Egyrészt a növények termelékenységének további jelentős javítása csak a fotoszintézis hatékonyságának növelésével lehetséges. Másrészt hatalmas lehetőségek rejlenek az olyan napenergia-átalakító biotechnológiai és mesterséges megoldások kifejlesztésében, amelyek a napenergia-biomassza átalakításban meghaladják a természetes fotoszintézis hatékonyságát. A fotoszintézis fotofizikai és -kémiai mechanizmusainak részletes, molekuláris szintű megértése, amely azonosítja a természetes fotoszintetikus rendszerekben meglévő különböző szűk keresztmetszeteket és korlátokat, előfeltétele e célok elérésének.

Növények és algák esetében, a fotoszintetikus folyamat a fotonok pigmentmolekulák általi abszorpciójával kezdődik, melyek a tilakoidmembránban lévő két – I. (PSI) és II. (PSII) – fotokémiai rendszer valamelyikéhez kapcsolódnak. A legtöbb pigment – klorofilok (Chl), karotinoidok vagy fikobilinok - speciális fénybegyűjtő komplexekbe (LHC) szerveződik, amelyek a fotoszintetikus apparátus alapvető alkotóelemei. Az LHC-ben lévő pigmentek közötti intermolekuláris (excitonikus) kölcsönhatások lehetővé teszik a gerjesztési energia gyors átadását a fotokémiai rendszer reakciócentrumában (RC) lévő speciális Chl-molekuláknak. A töltésváltoztatás az RC-ben elindítja az elektrontranszportláncot, amely az

ATP és NADPH előállításához vezet, amelyeket végül a CO₂ szénhidráttá történő redukciójára használnak fel a fotoszintetikus szervezetek. Az egész folyamat attól függ, hogy a fénybegyűjtő antenna képes-e energiát átadni az RC-knek, amihez viszont nagyszámú (jellemzően néhány száz) pigmentmolekulára van szükség, amelyek a gyors és hatékony gerjesztési-energia-átadás (EET) révén funkcionálisan kapcsolódnak az RC-hez.

A II. fénybegyűjtő komplex (LHCII) a PSII fő antennája a növényekben és zöldalgákban, és az összes pigment-fehérje komplex közül a legnagyobb mennyiségben fordul elő a tilakoidmembránban, megkövetve a Chl-ok közel felét. A zárvatermők (angiospermák) nukleáris genomja által kódolt Lhcb1-6 homológ fehérjék több Chl-a, Chl-b és karotinoidot (xantofill) kötnek, és a PSII-höz társuló monomer (Lhcb4-6) és trimer (Lhcb1-3) komplexeket alkotnak. A fő LHCII trimer (1. ábra) monomerenként 8 Chl-a-t, 6 Chl-b-t és 4 xantofillt tartalmaz. Az ezen pigmentek közötti



1. ábra. Az LHCII monomer sematikus szerkezete. A színes gömbök a Chl központi Mg és N atomjait jelölik. A szorosan kapcsolt Chl-ok azonos színűek. Az ábra a PDB ID 1RWT alapján készült.

EET-t különböző időfelbontásos spektroszkópai módszerekkel és elméleti megközelítések segítségével vizsgálták. A Chl-ok közötti EET többfázisú folyamat, amely szobahőmérsékleten több száz femtoszekundumtól néhány pikoszekundumig terjedő időskálán játszódik le. A rengeteg adat ellenére azonban nincs teljes konszenzus az EET dinamikájáról és útjairól, különösen a Chl-a excitonállapotok sokaságában.

A fotoszintézist több visszacsatolási mechanizmus és szenzor dinamikusan szabályozza, hogy alkalmazkodni tudjon a változó környezeti és fiziológiai feltételekhez. A gyenge fényviszonyok melletti optimális fotoszintézishez elengedhetetlen a nagy méretű fénybegyűjtő antenna. Nagy fényintenzitásnál azonban a fotokémiai rendszerekhez jutó gerjesztési energia meghaladhatja a fotoszintézishez szükséges kapacitást, ami veszélyes túlgerjesztett állapotokat hoz létre, amelyekben a felesleges energia reaktív oxigén formákat (ROS) hoz létre, ami fénygátlást és sejtkárosodást eredményez.

Az LHCII aktív szerepet játszik a gerjesztésienergia-áramlás kiegyensúlyozásában mindkét fotokémiai rendszer felé, a fotoszintetikus apparátus más komponenseivel együtt, több független mechanizmuson keresztül. Az LHCII fénybegyűjtő funkciója hatékonyan kikapcsolható a komplexben lévő Chl gerjesztett állapotok gyors, nonradiatív deaktiválásával, amit nem-fotokémiai kioltásnak (NPQ) nevezünk.

Az erős fényt *in vivo* a belső tilakoid régió (lumen) savasodása érzékeli, ami elősegíti a PSII PsbS fehérjéjének aktiválódását és a violaxantin karotinoid zeaxantinná történő átalakulását. A PsbS és a zeaxantin kölcsönhatásba lép az LHCII-vel aktiválva az NPQ-t, ami a tilakoidmembrán szerkezeti átrendeződésével és valószínűleg az LHCII konformációs

változásaival jár. Az NPQ aktiválásának pontos molekuláris mechanizmusa és a kioltás fizikai mechanizmusa azonban még mindig vitatott.

Az LHCII döntő szerepet játszik a két fotokémiai rendszer közötti energiaáramlás kiegyensúlyozásában is, az állapotátmenetekben, ahol a rendszerközi elektronkészlet redoxállapota irányítja az LHCII reverzibilis foszforilációját. A nem-foszforilált LHCII elsősorban a PSII-hez kötődik (1. állapot), míg a foszforilált LHCII a PSI-hez vándorol és hozzákapcsolódik, növelve annak abszorpció hatáskeresztmetszetét (2. állapot). Az utóbbi években azonban egyre több bizonyíték gyűlt össze arra, hogy az LHCII foszforiláció nélkül is képes PSI-antennaként működni.

2. CÉLOK

A jelen értekezésben összefoglalt kutatómunka célja az LHCII azon szerkezet–funkció összefüggéseinek feltárása volt, amelyek funkcionális flexibilitással és a PSII és PSI közötti energiaáramlás szabályozásának képességével ruházzák azt fel. A kutatás fő célkitűzései a következők voltak:

1. Feltárni az LHCII molekuláris környezetének és intermolekuláris kölcsönhatásainak a Chl gerjesztett állapotok tulajdonságaira és a komplex gerjesztett állapotainak dinamikájára gyakorolt hatását.

Ismert, hogy az LHCII elsődleges fénybegyűjtő funkciója intermolekuláris kölcsönhatások révén hangolható, és feltételezhető, hogy az NPQ aktiválása valamilyen konformációváltozást jelent a komplexben. Az izolált LHCII molekuláris környezetének szisztematikus megváltoztatásával, illetve a konformációs és funkcionális változásokra utaló spektroszkópiai paraméterek megfigyelésével, célunk az LHCII működésének szabályozó mechanizmusaira vonatkozó adatok keresése volt.

2. Feltárni a gerjesztés kioltást irányító molekuláris és fizikai mechanizmusokat az LHCII-ben az in vivo NPQ viszonylatában.

Az NPQ fizikai mechanizmusa nem ismert, habár léteznek különböző javasolt mechanizmusok és azokat alátámasztó kísérleti bizonyítékok. Az egyik lehetséges mechanizmus a Chl-Chl töltésátviteli állapotok kialakulását feltételezi az LHCII-ben. Célunk ezen állapotok in vivo és in vitro NPQ-val való kapcsolatának tisztázása volt.

3. Feltérképezni az LHCII excitonszerkezetét, mely összekapcsolja a molekuláris szerkezetet a fotofizikai funkcióval.

Jelenleg több modell létezik az LHCII Chl gerjesztett állapotok energiáiról, amelyek meghatározzák az energiatranszfer-kaszkádot a rendszerben. Az új megközelítéseket alkalmazó optikai spektroszkópiái, mint pl. az ACD spektroszkópiái kísérletek és az elméleti modellezés kombinálásának célja az LHCII Chl gerjesztett állapotok és ezek dinamikájának alaposabb leírása, valamint a specifikusan hozzájáruló Chl-ok meghatározása volt.

4. Részletes információkat szerezni az LHCII-ben, illetve a tilakoidmembrán különböző komplexei között lejátszódó EET dinamikáját tekintve, amelyek segíthetik a fénybegyűjtés kinetikai korlátainak megértését.

A természetes fotoszintetikus membránok sűrűn rendezett pigment-fehérje komplexeket tartalmaznak, ami lehetővé teszi a hosszútávú energiaátadást. Natív és rekonstituált LHCII-t tartalmazó membránokat és aggregátumokat használtunk ahhoz, hogy meghatározzuk az energiatranszfer korlátait, az úgynevezett doménméretet, és az LHCII és PSI közötti energetikai csatolást.

3. MÓDSZEREK

3.1. Mintaanyag

A kísérletek többségét leválasztott növényi leveleken (*Arabidopsis*) *in vivo* vagy *in vitro*: borsóból vagy spenótból izolált tilakoidmembránokon, natív LHCII-ben gazdag membránokon, PSII-ben gazdag membránokon (BBY részecskék) és izolált pigment-fehérje komplexeken – LHCII és PSI – végeztük.

A molekuláris környezetnek az LHCII szerkezetére és dinamikájára gyakorolt hatásának vizsgálatához az izolált LHCII-t detergens micellákba, detergens-mentes polimer gélekbe, aggregátumokba és makro-aggregátumokba, vagy különböző lipidtartalmú és lipid:fehérje arányú rekonstituált membránokba (proteoliposzómákba) ágyztuk.

Hogy a lipid:fehérje arányt nyomon követhessük, fluoreszcens lipidmarkerekkel rekonstituált LHCII membránokat készítettünk, melyeket a molekulák együttes átlagán végzett illetve egymolekula-spektroszkópiai kísérletekben alkalmaztunk.

PSI-t és LHCII-t meghatározott moláris arányban tartalmazó, rekonstituált membránok segítségével az LHCII-ről a PSI-re történő energiaátadást tanulmányoztuk *in vitro*.

3.2. Optikai spektroszkópia

A fotoszintetikus rendszerek szerkezeti és funkcionális tulajdonságainak vizsgálatára számos optikai spektroszkópiai módszert alkalmaztunk.

3.2.1. Cirkuláris dikroizmus spektroszkópia

A cirkuláris dikroizmus (CD) – a bal és jobb irányban cirkulárisan polarizált fény abszorpciójának különbsége – rendkívül érzékeny az excitonikusan csatolt pigmentek kölcsönhatási energiájára és kölcsönös geometriájára, ezért egy hasznos szerkezetvizsgáló eszköz. A CD-spektroszkópiát az LHCII pigmentek excitonikus kölcsönhatásaiban különböző molekuláris környezetekben bekövetkező változások tanulmányozására alkalmazzuk.

A CD-spektroszkópia kiterjesztése, a makroszkópiusan orientált minták anizotróp CD-je (ACD) lehetővé teszi az excitonikus CD-sávok egymástól független mérését, és olyan további értékes információkat nyújt, amelyek a hagyományos izotróp CD-spektroszkópia során elvesznek: például az excitonállapotok pontos energiaszintjei és a mögöttük álló átmeneti dipólusmomentumok orientációi. A membrán- és lamellaszerkezetek síkbeli geometriájuk miatt természetesen alkalmasak az ACD-spektroszkópiára. A natív és rekonstituált LHCII:lipid membránok orientálása mágneses mezőkkel, poliakrilamid-gél kompressziójával vagy a membránok kvarcfeületen történő leszáritásával történt.

3.2.2. Fluoreszcenciaspektroszkópia

A Chl fluoreszcencia emissziós spektrumokat alacsony hőmérsékleten (77 K) mértük leveleken, membránokon és izolált komplexeken, ezáltal tanulmányozva a fluoreszcencia-hatásfok és az energia megoszlásának változását a PSII (LHCII) – amely elsősorban a 680–690 nm-es tartományban emittál – és a PSI között – amelynek a csúcsemisziója 720–730 nm-en van. Az LHCII alacsony hőmérsékletű spektrumait arra is

felhasználtuk, hogy kimutassuk az alacsony energiájú Chl-állapotok megjelenését az LHCII-ben, amelyek az NPQ-hoz kapcsolódnak.

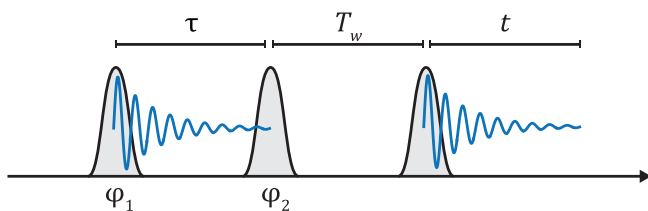
Az NPQ aktiválásához kapcsolódó klorofillfluoreszcencia-emisszió spektrális változásait *in vivo* követtük nyomon egy speciálisan erre a célra tervezett impulzusmodulált Chl-fluoreszcencia-indukciós spektrométerrel. Rövid folyamatos vörös fényel elindítottuk az NPQ generálását, majd megszakításos kék telítő fényimpulzusokat alkalmaztunk a fluoreszcencia-hatásfok és a spektrális változások mérésére egy CCD-rácsos spektrométerrel. Az NPQ relaxációját is követtük az aktinikus vörös fény kikapcsolása után.

3.2.3. Időfelbontásos fluoreszcenciaspektroszkópia

A Chl-fluoreszcencia-lecsengés kinetikákat pikoszekundumos időfelbontással rögzítettük időkorrelált egyfoton számláló készülékkel. A különböző emissziós hullámhosszokon rögzített fluoreszcenciakinetikákat globális multiexponenciális illesztésnek vetettük alá a műszer válaszfüggvényével való rekonvolúciójával kombinálva, hogy feloldjuk a különböző lecsengési-élettartam komponenseket a ~ 10 ps – néhány ns tartományban, valamint az ezeknek megfelelő lecsengés-asszociált emissziós spektrumokat (DAES). Ezek az adatok feltárták az LHCII gerjesztett állapotú Chl-élettartamok változásait, valamint az EET dinamikáját membránokban az LHCII-k között és az LHCII-ről más komplexekre (PSI). Kinetikai kompartmentális modellezést alkalmaztunk a mikroszkopikus sebességi állandókra és a köztitermékek koncentrációjára való következtetés céljából.

3.2.4. Kétdimenziós elektronspektroszkópia

A kétdimenziós elektronspektroszkópia (2DES) fontos és alapvető eszközzé vált a különböző fizikai, kémiai és biológiai rendszerek vizsgálatában. A 2DES a pumpa-próba tranziens abszorpciós spektroszkópia kiterjesztésének tekinthető, ahol a jel frekvenciabontott mind a pumpa- (gerjesztés), mind a próbaimpulzusok (detektálás) tekintetében. Ezért a 2DES előnye, hogy az EET-folyamatban részt vevő donor- és akceptorállapotok spektrális információit elkülönítve szolgáltatja. Fourier-transzformációs 2DES méréseket (2. ábra) végeztünk izolált LHCII-n 30–55 fs időtartamú lézermimpulzusokkal, amelyekkel rögzítettük a 2D elektronspektrumokat a Chl Q_y hullámhossztartományban, a gerjesztési dinamikát 100 fs-tól 1 ns-ig terjedő időtartományban vizsgálva.



2. ábra. Impulzussorozat a 2DES-ben. Az első két impulzus gerjesztő impulzusként hat, és egy kezdeti (gerjesztett) állapotot hoz létre a relatív fázisuk és a közöttük lévő időközleltetés (koherenciaidő, τ) függvényében. Egy harmadik impulzus a T_w várakozási idő után vizsgálja a rendszert. Az $S(\tau, T_w, t)$ jelet τ és t mentén Fourier-transzformáljuk, hogy megkapjuk a kétdimenziós elektronspektrumot $\tilde{S}(\omega_\tau, T_w, \omega_t)$, ahol ω_τ és ω_t a gerjesztési, illetve a detektálási frekvencia.

4. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Az LHCII szerkezete és gerjesztési sajátosságai érzékenyek a komplex molekuláris környezetre.

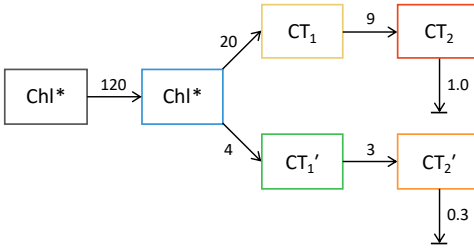
a. A detergens-micellákban szolubilizált izolált LHCII, a detergensmentes aggregátumok, a mosott gélekben lévő nem aggregált LHCII és a rekonstituált membránokba ágyazott LHCII CD spektrumának összehasonlításával specifikus spektrális változásokat mutattunk ki, amelyeket a fehérje-fehérje, lipid-fehérje vagy detergens-fehérje kölcsönhatások következtében a Chl és karotinoid excitonállapotokban bekövetkező változásoknak tulajdonítottunk. Például az aggregáció (LHCII-LHCII kölcsönhatások) és a detergens eltávolítása vagy cseréje specifikus változásokat idézett elő a CD-spektrumokban, ami azt jelzi, hogy az ilyen típusú intermolekuláris kölcsönhatások különböző excitonállapotokat, illetve pigmentmolekulákat befolyásolnak. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az LHCII excitonszerkezete érzékeny a molekuláris környezetre, és arra utalnak, hogy a komplex gerjesztési tulajdonságai a natív membránkörnyezetben és a detergenssel szolubilizált állapotban nem feltétlenül azonosak. Ezért a komplex szerkezeti és funkcionális plaszticitását figyelembe kell venni, amikor *in vitro* kísérletekből következtetünk a fiziológiai működésre.

b. A rekonstituált lipid-fehérje membránok hasznos, natív jellegű modellrendszert jelentenek; a vizsgálatok azonban részben a proteoliposzóma makroszerkezetének nagyfokú heterogenitása miatt továbbra is kihívást jelentenek. A lipidmarkerek és a sűrűség szerinti fizikai-kémiai elválasztás kombinált alkalmazása kimutatta, hogy a rekonstituált LHCII

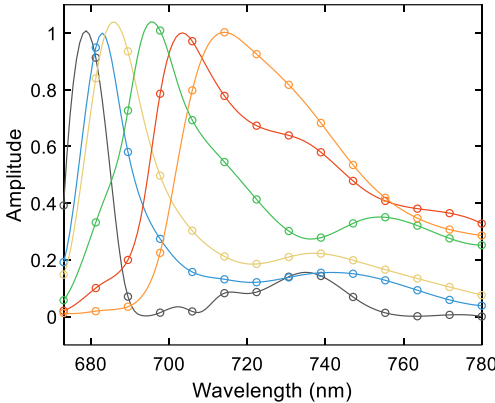
proteoliposzómák a részecskeméret és a fehérjesűrűség (lipid:fehérje arány) tekintetében figyelemre méltóan heterogének. Az LHCII erős hajlamot mutatott arra, hogy fehérjedús membrándoménekké tömörüljön, és ritkán vagy egyáltalán nem volt megtalálható lipidekkel körülvevett, önálló komplexként. Meglepő módon aggregáció-specifikus CD-jeleket nem figyeltünk meg a rekonstituált LHCII-membránokban, hanem csak a natív LHCII-ben gazdag membránokban és a lipidmentes aggregátumokban, ami azt jelzi, hogy az LHCII még membránkörnyezetben is felvehet különböző szerkezeti és makroszerkezeti állapotokat, amelyek befolyásolják az excitonrendszert.

2. A klorofill töltésátviteli állapotok az LHCII-t olyan mechanizmussal ruházzák fel, amellyel a környezettől függően önszabályozza fénybegyűjtő funkcióját in vitro és in vivo.

a. A molekuláris környezetnek mélyreható hatásai vannak az LHCII pigmentek gerjesztési dinamikájára. Az LHCII önszgregációja és klasztereződése a rekonstituált membránokban a Chl-ok fluoreszcencia-hatásfokának és gerjesztési élettartamának csökkenését eredményezi. A kioltás mértéke fordítottan korrelál a lipid:fehérje aránnyal széles értéktartományban. Az 1000:1 feletti lipid:fehérje molarányú proteoliposzómákban az LHCII Chl-fluoreszcencia-élettartama hasonlóan bizonyult a detergenssel szolubilizált LHCII-benihez (kb. 3,5 ns). Nagy fehérjesűrűségnél a fluoreszcencia-élettartamok több mint 10-szeresükre csökkentek, és a lipidmentes LHCII aggregátumokkal megegyező mértékű fluoreszcencia-kioltást mutattak. Ezek az eredmények az LHCII-nek a gerjesztési élettartamát szabályozó saját képességét bizonyítják.



3. ábra. Az LHCII-aggregátumok energiaátadási kinetikai modellje 77 K-en. A Chl* excitonállapotok különböző töltésátviteli állapotokká (CT) változhatnak. A számok sebességi állandókat jelölnek ns⁻¹-ben.



4. ábra. A mért időfelbontásos fluoreszcenciának a kinetikai modellhez való illesztéséből származó szpéciesz-asszociált normalizált emissziós spektrumok. A töltésátviteli állapotok a távoli vörös tartományban emitálnak.

b. Az LHCII aggregátumokban és a lipidmembránokban a fluoreszcencia-kioltás mindig távoli vörös fluoreszcenciaemisszió megjelenésével jár (700–720 nm hullámhosszon). Az emisszió alacsonyan fekvő, kifejezett töltésátviteli jellegű Chl-excitonállapotokból származik, amelyek tulajdonságai jelentősen függenek a molekuláris környezettől. A többszörös töltésátviteli állapotok létezését az LHCII aggregátumokban és kristályokban is igazoltuk időfelbontásos fluoreszcenciaspektroszkópiával kriogénikus hőmérsékleten (3. és 4. ábra). Ezzel szemben a detergenssel szolubilizált, nem-kioltott LHCII-ben nem észleltek alacsonyan elhelyezkedő, távoli vörös sugárzást kibocsátó töltésátviteli állapotokat. Maguk a töltésátviteli állapotok viszonylag hosszú gerjesztési élettartammal rendelkeznek, de ennek ellenére képesek a gerjesztett állapotú pigmentek energiájának

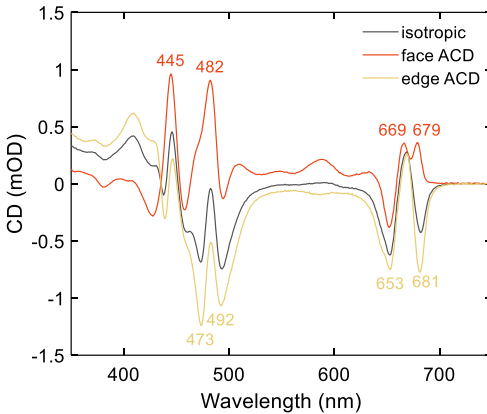
csapdázására, és mint ilyenek, a nem-fotokémiai kioltás egy lehetséges mechanizmusát jelentik. A rekonstituált és natív membránokban, valamint az intakt levelekben a fluoreszcenciakioltás indukciójakor megfigyelt távoli vörös emisszió hasonlósága arra utal, hogy a töltésátviteli mechanizmus nem csak az LHCII sajátja, hanem a növényekben a fotoprotektív, nem-fotokémiai kioltás része.

c. A Chl-fluoreszcencia-indukciós spektroszkópia új módszerével kimutattuk a nem-fotokémiai kioltás különböző kinetikai komponenseinek – qE (gyorsan reverzibilis) és qZ vagy qI (tartós) – spektrális jeleit intakt Arabidopsis levelekben. Megállapítottuk, hogy a töltésátviteli állapotok kioltásának távoli vörös fluoreszcencia-jele egybeesik a qE indukciójával, és kvantitatívan korrelál a qE nagyságával, a qI-ével vagy qZ-ével viszont nem. Ezek az eredmények alátámasztják azt az elképzelést, hogy 1) ez a fizikai mechanizmus közös az izolált LHCII-ben, valamint az in vivo kioltásban, és 2) hogy in vivo többféle kioltási mechanizmus működik különböző időskálákon.

3. Az anizotróp CD spektroszkópia segít az excitonikus átmenetek azonosításában és a szerkezetalapú excitonmodellek validálásában.

a. A makroszkópiusan orientált pigment-fehérje komplexek, mint például az LHCII, orientált CD-je vagy anizotróp CD-je (ACD) további információkat tár fel a gerjesztett állapotaikról, amelyek az oldatban lévő véletlenszerűen orientált fehérjék CD-jében elvesznek. Az ACD-spektroszkópia előnye, hogy az optikai átmeneteket az alapul szolgáló átmeneti dipólusmomentumaik orientációja szerint különválasztja, és az orientált membránfehérjék, mint pl. az LHCII esetében lehetővé teszi, hogy a

membrán síkjában és a membrán síkjából kifelé orientált átmeneteket külön-külön megfigyeljük (5. ábra).

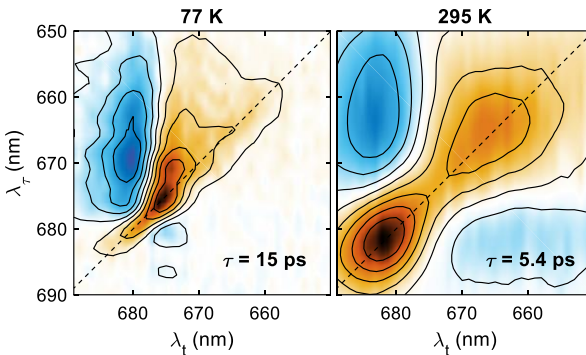


5. ábra. LHCII-membránok CD („isotropic”) és ACD („face” és „edge”-orientált) spektrumai. A „face” és „edge”-orientált ACD-spektrumok a membrán síkjával párhuzamos és arra merőleges átmenetektől származó sávokra bontják az excitonikus CD-spektrumot.

b. A pigment-fehérje komplexek fotofizikai funkciójának legrészletesebb megismerését az előrejelzett és a kísérleti optikai spektrumok összehasonlítása által végzett szerkezetalapú excitonszámítások teszik lehetővé. Az ACD-spektrumok potenciálisan növelik a szerkezetalapú excitonmodellek hitelességét és megbízhatóságát azáltal, hogy a modellezett excitonikus átmenetek orientációját is korlátozzák. Az LHCII ACD-spektrumának egy korábban javasolt exciton-Hamilton-operátor segítségével végzett számításai reprodukálták a kísérleti spektrumok kvalitatív jellemzőit a Chl Q_y tartományban. Továbbá kimutatták, hogy a legvörösebb ACD-sávhoz az a604, a610 és a613 Chl-ek járulnak hozzá, amelyek a legalacsonyabb energiájú excitonállapotokat képezik.

4. Kétdimenziós elektronspektroszkópiával (2DES) részletes ismereteket szereztünk az LHCII Chl-ok közötti energiaátadás dinamikájáról.

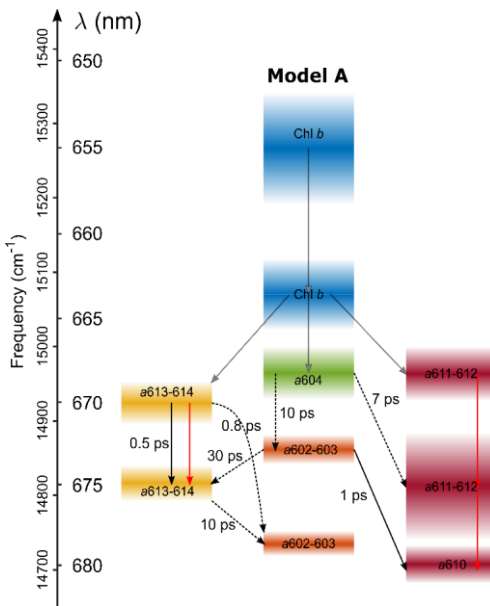
a. A 2DES a Chl b és a Chl a különböző összekapcsolt csoportjait, valamint egyidejűleg felfelé és lefelé irányuló energiaátadást mutatott ki a Chl a sokaságban. Az excitonok ekvilibrációja szobahőmérsékleten legfeljebb 5 ps-os időskálán történt (6. ábra).



6. ábra. Kétdimenziós lecsengés-asszociált spektrumok (DAES), amelyek a felbontott leglassabb energiaátadási komponenseket mutatják az LHCII-ben 77 és 295 K hőmérsékleten, 15 és 5,4 ps-os élettartammal. Alacsony hőmérsékleten az energiaátadás lassabb, főleg a donor és akceptor állapotok közötti kisebb spektrális átfedés miatt. Továbbá szobahőmérsékleten a felfelé irányuló energiaátviteli utak aktiválódnak, ami az átlós vonal alatti keresztcsúcsot eredményezi.

b. Az energiaátadás az LHCII-ben erősen hőmérsékletfüggő. A végállapotokkal való ekvilibráció sebessége 77 K hőmérsékleten háromszorosára lassult a szobahőmérséklethez képest. A statikus energetikai rendezetlenség a fehérje üvegesedési átmenete alatti hőmérsékleten (<230 K) áll be. A fehérjemozgások befagyasztása a részletes egyensúly előrejelzéseinek megfelelően blokkolta a felfelé vezető energiaátadási utakat. Ez nagy hatással van a teljes energiaátadási sebességre.

c. A fenomenológiai modellillesztés segítségével a kétdimenziós spektroszkópai adatokból olyan megbízható fizikai paraméterek nyerhetők ki, mint például az excitonállapotok energiái, a homogén és inhomogén szélességek és az energiaátadás mikroszkopikus sebességi állandói. Az LHCII spektro-kinetikai modellje (7. ábra) három, egymással gyengén csatolt terminális Chl-állapotot és a magasabb energiájú excitonállapotok közötti ekvibrációt mutatja az LHCII-ben.



7. ábra. Az EET modellje a trimer LHCII-ben 77 K-en 2DES alapján. Az excitonikus energiaszintek színei erősen csatolt doméneket jelölnek, kivéve a kék színt, amely a Chl b sokaságot jelöli. A nyilak csak a lefelé irányuló energiaátadási útvonalakat jelölik.

5. Az LHCII egy spektrálisan hangolható fénybegyűjtő antenna.

a. A *Bryopsis corticulans* zöldalga LHCII-je a rövid hullámhosszú fény fokozott abszorpciójához alkalmazkodott a megváltozott pigment-összetétel révén. Két új, rövid hullámhosszú Chl-állapotot azonosítottunk a leghosszabb hullámhosszú állapotok rovására. A szélesebb abszorpciós spektrum a komplexen belüli lassabb energiaátadás rovására megy, ami

azonban nem befolyásolja negatívan a fotoszintetikus hatékonyságot. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az LHCII egy robusztus és hangolható rendszer, amely a hatékonyság megőrzésével is képes alkalmazkodni a fényviszonyokhoz.

6. Az LHCII-komplexek közötti energiaátadás sebessége nagymértékben meghatározza a II. fotokémiai rendszer funkcionális antennaméretét a tilakoidmembránokban.

a. Az LHCII-aggregátumokban, mesterséges és natív membránokban a funkcionálisan csatolt domének száma körülbelül 25 trimer komplexre korlátozódik. Ez a szám jó összhangban van a "fotoszintetikus egység" méretére vonatkozó becslésekkel, az egymással összekapcsolt Chl-ok számát tekintve.

b. Míg *in vitro* nagyobb fizikai aggregátumok előállítása lehetséges, a funkcionális antenna méretét elsősorban az LHCII-komplexek közötti energiaátadás sebessége korlátozza.

7. Az LHCII hatékony antenna mindkét fotokémiai rendszer számára.

a. A modellmembránokban az LHCII képes az elnyelt energiát a PSI-nek átadni, ezáltal növelve a fotokémiai rendszer abszorpciós hatáskeresztmetszetét. Az energiaátadás időskálái arra engednek következtetni, hogy az LHCII és a PSI több helyen kapcsolódnak. Ily módon a fotoszisztéma effektív antennamérete 50%-kal növelhető, miközben a fotokémiai kvantumhatásfok 90% körül marad. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy kivitelezhetők olyan hatékony biohibrid rendszerek, amelyek a kívánt funkcionális antennamérettel rendelkeznek.

5. Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Akhtar P, Do TN, Nowakowski PJ, Huerta-Viga A, Khyasudeen MF, Lambrev PH, Tan H-S (2019) Temperature dependence of the energy transfer in LHCII revealed by two-dimensional electronic spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry B* 123: 6765–6775
2. Akhtar P, Dorogi M, Pawlak K, Kovacs L, Bota A, Kiss T, Garab G, Lambrev PH (2015) Pigment interactions in light-harvesting complex II in different molecular environments. *J Biol Chem* 290: 4877–4886
3. Akhtar P, Görföl F, Garab G, Lambrev PH (2019) Dependence of chlorophyll fluorescence quenching on the lipid-to-protein ratio in reconstituted light-harvesting complex II membranes containing lipid labels. *Chemical Physics* 522: 242–248
4. Akhtar P, Lindorfer D, Lingvay M, Pawlak K, Zsiros O, Siligardi G, Jávorfí T, Dorogi M, Ughy B, Garab G, Renger T, Lambrev PH (2019) Anisotropic circular dichroism of light-harvesting complex II in oriented lipid bilayers: Theory meets experiment. *The Journal of Physical Chemistry B* 123: 1090–1098
5. Akhtar P, Lingvay M, Kiss T, Deák R, Bóta A, Ughy B, Garab G, Lambrev PH (2016) Excitation energy transfer between light-harvesting complex II and photosystem I in reconstituted membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1857: 462–472
6. Akhtar P, Nowakowski PJ, Wang W, Do TN, Zhao S, Siligardi G, Garab G, Shen J-R, Tan H-S, Lambrev PH (2020) Spectral tuning of light-harvesting complex II in the siphonous alga *Bryopsis corticulans* and its effect on energy transfer dynamics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1861: 148191
7. Akhtar P, Zhang C, Do TN, Garab G, Lambrev PH, Tan H-S (2017) Two-dimensional spectroscopy of chlorophyll a excited-state equilibration in light-harvesting complex II. *The Journal of Physical Chemistry Letters* 8: 257–263
8. Do TN, Huerta-Viga A, Akhtar P, Nguyen HL, Nowakowski PJ, Khyasudeen MF, Lambrev PH, Tan H-S (2019) Revealing the excitation energy transfer network of

- Light-Harvesting Complex II by a phenomenological analysis of two-dimensional electronic spectra at 77 K. *The Journal of Chemical Physics* 151: 205101
9. Enriquez MM, Akhtar P, Zhang C, Garab G, Lambrev PH, Tan HS (2015) Energy transfer dynamics in trimers and aggregates of light-harvesting complex II probed by 2D electronic spectroscopy. *J. Chem. Phys.* 142: 212432
 10. Lambrev PH, Miloslavina Y, Jahns P, Holzwarth AR (2012) On the relationship between non-photochemical quenching and photoprotection of photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1817: 760–769
 11. Lambrev PH, Nilkens M, Miloslavina Y, Jahns P, Holzwarth AR (2010) Kinetic and spectral resolution of multiple nonphotochemical quenching components in *Arabidopsis* leaves. *Plant Physiol.* 152: 1611–1624
 12. Lambrev PH, Schmitt FJ, Kussin S, Schoengen M, Várkonyi Z, Eichler HJ, Garab G, Renger G (2011) Functional domain size in aggregates of light-harvesting complex II and thylakoid membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1807: 1022–1031
 13. Miloslavina Y, Lambrev PH, Jávorfí T, Várkonyi Z, Karlický V, Wall JS, Hind G, Garab G (2012) Anisotropic circular dichroism signatures of oriented thylakoid membranes and lamellar aggregates of LHCII. *Photosynthesis Research* 111: 29–39
 14. Ostroumov EE, Gotze JP, Reus M, Lambrev PH, Holzwarth AR (2020) Characterization of fluorescent chlorophyll charge-transfer states as intermediates in the excited state quenching of light-harvesting complex II. *Photosynthesis Research* 144: 171–193
 15. Tutkus M, Akhtar P, Chmeliov J, Görföl F, Trinkunas G, Lambrev PH, Valkunas L (2018) Fluorescence Microscopy of Single Liposomes with Incorporated Pigment–Proteins. *Langmuir* 34: 14410–14418
 16. Wells KL, Lambrev PH, Zhang ZY, Garab G, Tan HS (2014) Pathways of energy transfer in LHCII revealed by room-temperature 2D electronic spectroscopy. *Physical Chemistry Chemical Physics* 16: 11640–11646

**Biological Research Centre, Szeged
Institute of Plant Biology**



Petar H. Lambrev

**On the role of light-harvesting complex II
in regulating the excitation energy flow**

Dissertation Summary

Szeged, 2022

1. SCIENTIFIC BACKGROUND

Nearly all life on Earth is fundamentally sustained by energy from the Sun stored in the process of photosynthesis. Intensifying research in photosynthesis is a logical and necessary step to overcome serious challenges that humankind is facing today – satisfying the increasing demands for food and energy, while simultaneously reducing carbon and other greenhouse gas emissions. On one hand, further significant improvements of crop productivity are only possible through enhanced photosynthetic efficiency. On the other hand, there is a vast potential for developing biotechnological and artificial solutions for solar energy conversion that exceed the solar-to-mass efficiency of natural photosynthesis. Detailed, molecular-level understanding of the photophysical and photochemical mechanisms of photosynthesis that identifies the various bottlenecks and limitations existing in natural photosynthetic systems is a prerequisite to achieve either of these goals.

The photosynthetic process in plants and algae begins with the absorption of photons by any of the pigment molecules associated with the two photosystems in the thylakoid membrane, photosystem I (PSI) and photosystem II (PSII). Most of the pigments – chlorophylls (Chls), carotenoids or phycobilins – are organized in specialized light-harvesting complexes (LHCs) – an essential component of the photosynthetic apparatus. Intermolecular (excitonic) interactions between pigments in the LHCs allow the excitation energy to be rapidly transferred to the special Chl molecules in the photosystem reaction centres (RCs). Charge separation in the RC initiates the electron-transport chain that ultimately drives the

generation of ATP and NADPH, which are then used for reducing CO₂ to carbohydrates. The entire process depends on the ability of the light-harvesting antenna to supply energy to the RCs, which in turn requires a large number (typically a few hundred) of pigment molecules that are functionally connected to the RC via fast and efficient excitation energy transfer (EET).

Light-harvesting complex II (LHCII) is the principal antenna of PSII in plants and green algae and is the most abundant of all pigment-protein complexes in the thylakoid membrane, binding about half of the Chl. The nuclear genome of angiosperms encodes the homologous proteins Lhcb1-6 that bind several Chl a, Chl b and carotenoids (xanthophylls) to form monomeric (Lhcb4-6) and trimeric (Lhcb1-3) complexes associated with PSII. The major trimeric LHCII (Figure 1) contains 8 Chl a, 6 Chl b, and 4 xanthophylls per monomer. EET between these pigments has been

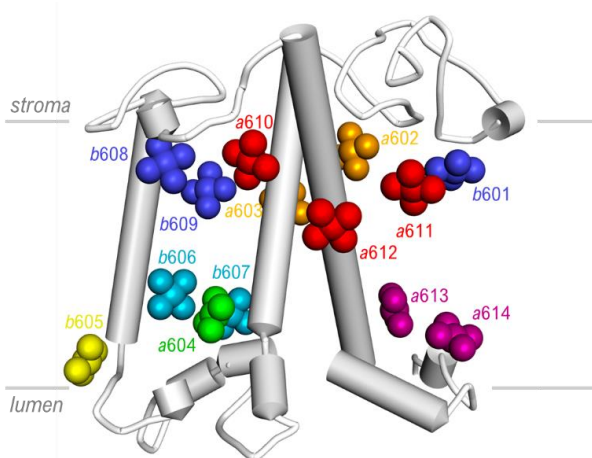


Figure 1. Schematic structure of the LHCII monomer. The coloured spheres represent the central Mg and N atoms of the bound chlorophylls. Strongly coupled chlorophylls have the same colour. Created using PDB ID 1RWT.

studied with the help of various time-resolved spectroscopic techniques and theoretical approaches. EET between Chls is a multi-phasic process occurring on timescales from hundreds of femtoseconds to several picoseconds at room temperature. However, despite the wealth of data, there is no complete consensus on the dynamics and pathways of EET especially in the manifold of Chl *a* exciton states.

Photosynthesis is dynamically regulated by multiple feedback mechanisms and sensors to adjust for the changing environmental and physiological conditions. A large light-harvesting antenna is crucial for optimal photosynthesis under low light. At high light intensity, however, the excitation energy delivered to the photosystems can exceed the capacity for photosynthesis, creating dangerous overexcitation conditions, where the excess energy creates ROS that result in photoinhibition and cellular damage. LHCII plays an active role in balancing the excitation energy flow to both photosystems, together with other components of the photosynthetic machinery, via several independent mechanisms. The light-harvesting function of LHCII can be effectively switched off by fast nonradiative deactivation of Chl excited states in the complex, a process termed non-photochemical quenching (NPQ). High light is sensed *in vivo* by the acidification of the inner thylakoid space (lumen), which promotes the activation of the PsbS protein of PSII and the conversion of the carotenoid violaxanthin to zeaxanthin NPQ. PsbS and zeaxanthin interact with LHCII to activate NPQ, which involves structural rearrangements in the thylakoid membrane and probably conformational changes in LHCII. The exact molecular mechanism of NPQ activation and the physical mechanism of quenching, however, are still debated.

LHCII also plays crucial part in balancing the energy flow between the two photosystems in the process of state transitions, whereby the redox state of the intersystem electron pool drives reversible phosphorylation of LHCII. Unphosphorylated LHCII is primarily bound to PSII (state 1), whereas phosphorylated LHCII migrates and attaches to PSI, augmenting its absorption cross-section (state 2). In recent years, however, evidence has accumulated that LHCII can function as a PSI antenna also without phosphorylation.

2. AIMS

The work summarized in the present dissertation aimed at elucidating the structure-function relationships in LHCII that endow it with a functional flexibility and the ability to regulate the energy flow to PSII and PSI. The main objectives of the research were:

1. To uncover the effects of the molecular environment and intermolecular interactions of LHCII on the Chl excited-state properties and excited-state dynamics of the complex.

It is known that the primary light-harvesting function of LHCII can be tuned by intermolecular interactions and it is proposed that the activation of NPQ involves some kind of conformational switch in the complex. By systematically altering the molecular environment of isolated LHCII and observing spectroscopic parameters indicative of conformational and functional changes, we aimed to find clues on the mechanisms of control of the LHCII function.

2. To reveal molecular and physical mechanisms governing excitation quenching in LHCII in relation with NPQ in vivo.

The physical mechanism of NPQ is not known, although there is no lack of different proposed mechanisms and experimental evidence supporting them. One of the candidate mechanisms involves the formation of Chl-Chl charge-transfer states in LHCII. We aimed to find conditions where these states can be detected in vivo and in vitro and elucidate their connection with NPQ.

3. To gain insight into the excitonic structure of LHCII, connecting molecular structure with photophysical function.

Presently there are several different models regarding the Chl excited-state energies of LHCII, which determine the energy transfer cascade in the complex. Optical spectroscopy experiments using new approaches such as ACD spectroscopy, combined with theoretical modelling, aimed to better characterize the Chl excited states in LHCII, their dynamics, and identify specific contributing Chls.

4. To gather detailed knowledge on the dynamics of EET in within LHCII and between different complexes in the thylakoid membrane, that can further our understanding of the kinetic limitations of light harvesting.

Native photosynthetic membranes are densely packed with pigment-protein complexes that enables long-range energy transport. We used native and reconstituted LHCII-containing membranes and aggregates to determine the limitations of energy transfer, the so-called functional domain size, and the efficiency of energetic coupling between LHCII and PSI.

3. METHODOLOGY

3.1. Sample material

The bulk of the experimental work was performed *in vivo* on detached plant (*Arabidopsis*) leaves and *in vitro* – on isolated thylakoid membranes from pea or spinach, native LHCII-enriched membranes, PSII-enriched membranes (BBY particles) and isolated pigment-protein complexes – LHCII and PSI.

To establish the effect of the molecular environment on the structure and dynamics of LHCII, isolated LHCII was incorporated in detergent micelles, or in detergent-free aggregates and macroaggregates. However, any structural or functional differences observed between the detergent-solubilized and aggregated LHCII can be attributed to either the external environment (water/detergent) or to aggregation (protein-protein interactions). To separate these two effects, LHCII was entrapped in detergent-free polymer gels that allowed the detergent to be removed from the system while keeping the protein from aggregating.

To test the effects of the lipid environment on the structure and function of LHCII, reconstituted membranes (proteoliposomes) with varying lipid content and lipid:protein ratios were used. Fluorescent lipid markers were additionally incorporated into the lipid membranes to accurately track the lipid:protein ratio of the reconstituted membranes in bulk and single-molecule spectroscopy experiments.

Reconstituted membranes were also used as a model system to study the efficiency and dynamics of energy transfer between LHCII and PSI.

To this end membranes were reconstituted with isolated PSI and LHCII separately or mixed together at defined molar ratios.

3.2. Optical spectroscopy

Several optical spectroscopy methods were employed to probe the structural and functional properties of the photosynthetic systems under study.

3.2.1. Circular dichroism spectroscopy

Circular dichroism (CD) - the difference in absorption of left and right circularly polarized light, is extremely sensitive to the interaction energy and to the mutual geometry of excitonically coupled pigments and a useful structural probe. CD spectroscopy was applied to study changes in the pigment excitonic interactions in LHCII occurring in different molecular environments.

An extension of CD spectroscopy, the anisotropic CD (ACD) of macroscopically oriented samples, allows for independent measurement of the excitonic CD bands and recovers additional valuable information, lost in the conventional isotropic CD spectroscopy, such as the exact energies of excitonic states and the orientation of the underlying transition dipole moments. Membrane and lamellar structures are naturally amenable to ACD spectroscopy because of their planar geometry. Alignment of native and reconstituted LHCII:lipid membranes was done by magnetic fields, polyacrylamide gel compression or by drying the membranes on quartz surface.

3.2.2. Fluorescence spectroscopy

Chl fluorescence emission spectra were recorded at low temperature (77 K) from leaves, membranes and isolated complexes to measure changes in the fluorescence yield and in the distribution of energy between PSII (LHCII), which emits primarily in the region 680-690 nm, and PSI – which has peak emission at 720-730 nm. Low-temperature spectra of LHCII were also used to detect the appearance of low-energy Chl states in LHCII that are associated with NPQ.

Spectral changes in the Chl fluorescence emission associated with the activation of NPQ were monitored *in vivo* by a specially designed pulsed Chl fluorescence induction spectrometer. Briefly continuous red light triggered the generation of NPQ and blue saturating light pulses were intermittently applied to measure the fluorescence yield and spectral changes with a CCD-array spectrometer. The NPQ relaxation was also followed after switching off the actinic red light.

3.2.3. Time-resolved fluorescence spectroscopy

Chl fluorescence decay kinetics were recorded with picosecond time resolution by the time-correlated single-photon counting technique. The fluorescence kinetics, recorded at different emission wavelengths were then subjected to global multiexponential fitting combined with re-convolution with the instrument response function to resolve multiple decay lifetime components from ~10 ps to several ns and the corresponding decay-associated emission spectra. These data revealed changes in the Chl excited-state lifetime of LHCII, as well as the dynamics of EET between LHCII and from LHCII to other complexes (PSI) in membranes. Kinetic

compartment modelling was applied to infer the microscopic rate constants and concentrations of intermediates.

3.2.4. Two-dimensional electronic spectroscopy

Two-dimensional electronic spectroscopy (2DES) has become an important and essential tool in the study of various physical, chemical, and biological systems. 2DES can be considered as an extension of pump-probe transient absorption spectroscopy, whereby the signal is frequency-resolved with respect to both the pump (excitation) and probe (detection) pulses. Hence, 2DES has advantage providing separate spectral information of donor and acceptor states involved in the EET process. Time-domain Fourier-transform 2DES measurements (Figure 2) were performed on isolated LHCII using laser pulses of 30-55 fs duration, recording 2D electronic spectra in the Chl Q_y wavelength region and probing the excitation dynamics over a time region from 100 fs up to 1 ns.

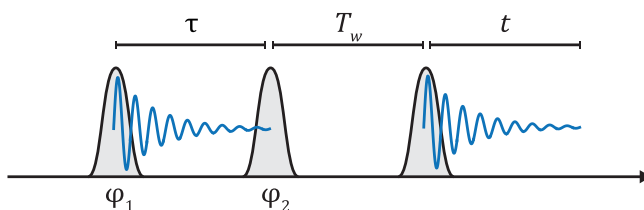


Figure 2. Pulse sequence in 2DES. The first two pulses act as excitation pulses creating an initial (excited) state depending on their relative phase and the time delay between them (coherence time, τ). A third pulse probes the system after waiting time T_w . The signal $S(\tau, T_w, t)$ is Fourier-transformed along τ and t to obtain the two-dimensional electronic spectrum $\tilde{S}(\omega_\tau, T_w, \omega_t)$, where ω_τ and ω_t are the excitation and detection frequencies, respectively.

4. NEW SCIENTIFIC RESULTS

1. The structure and excitation properties of LHCII are sensitive to the molecular surroundings of the complex.

a. Comparison of the CD spectra of isolated LHCII solubilized in detergent micelles, detergent-free aggregates, non-aggregated LHCII in washed gels, and LHCII embedded in reconstituted membranes revealed specific spectral changes ascribed to changes in the Chl and carotenoid exciton states due to protein-protein, lipid-protein, or detergent-protein interactions. For instance, aggregation (LHCII-LHCII interactions) and removal or replacement of the detergent invoked specific changes in the CD spectra indicating that these types of intermolecular interactions affect different excitonic states, respectively pigment molecules. These results show that the excitonic structure of LHCII is sensitive to the molecular environment and hint that the excitation properties of the complex in its native membrane environment and in a detergent-solubilized state may not be the same. Therefore, the structural and functional plasticity of the complex needs to be considered when inferring about physiological function from *in vitro* experiments.

b. Reconstituted lipid-protein membranes represent a useful native-like model system; however, investigations remain challenging in part because of a high degree of heterogeneity with respect to the proteoliposome macrostructure. The combined application of lipid markers and physico-chemical separation by density revealed that reconstituted LHCII proteoliposomes are remarkably heterogeneous in particle sizes and protein densities (lipid:protein ratios). LHCII showed strong propensity to

associate into protein-dense membrane domains and was rarely or not at all found as single complexes surrounded by lipids. Surprisingly, aggregation-specific CD signatures were not observed in reconstituted LHCII membranes but only in native LHCII-enriched membranes and lipid-free aggregates, indicating that even in membrane environment LHCII can adopt different structural and macrostructural states affecting the excitonic landscape.

2. Chlorophyll charge-transfer states endow LHCII with the mechanism to self-regulate its light-harvesting function depending on the environment in vitro and in vivo.

a. The molecular environment has profound effects on the pigment excitation dynamics in LHCII. Self-segregation and clustering of LHCII in reconstituted membranes results in reduction of the Chl fluorescence yield and excitation lifetime. The extent of quenching is inversely correlated with the lipid:protein ratio over a wide range of values. The chl fluorescence lifetime of LHCII in proteoliposomes with lipid:protein molar ratios over 1000:1 was found to be similar to that in detergent-solubilized LHCII (about 3.5 ns). At high protein densities the fluorescence lifetimes decreased more than 10-fold, showing fluorescence quenching of equal magnitude as in lipid-free LHCII aggregates. These results demonstrate an intrinsic capacity of LHCII to regulate the excitation lifetime.

b. The fluorescence quenching in LHCII aggregates as well as in lipid membranes is always accompanied by the appearance of far-red fluorescence emission (at wavelengths 700-720 nm). The emission originates

from low-lying Chl exciton states with pronounced charge-transfer character, whose properties markedly depend on the molecular environment. The existence of multiple charge-transfer states was confirmed in LHCII aggregates as well as crystals by time-resolved fluorescence spectroscopy at cryogenic temperatures (Figure 3). In contrast, no low-lying far-red-emitting charge-transfer states were detected in unquenched detergent-solubilized LHCII. The charge-transfer states themselves have relatively long excitation lifetimes but are nonetheless capable of trapping excitation energy from the bulk of pigments and as such present a viable mechanism of non-photochemical quenching. The similarity of the far-red emission observed in reconstituted and native membranes and in intact leaves upon induction of fluorescence quenching is an indication that the charge-transfer mechanism is not only inherent to LHCII but that it is part of photoprotective non-photochemical quenching in plants.

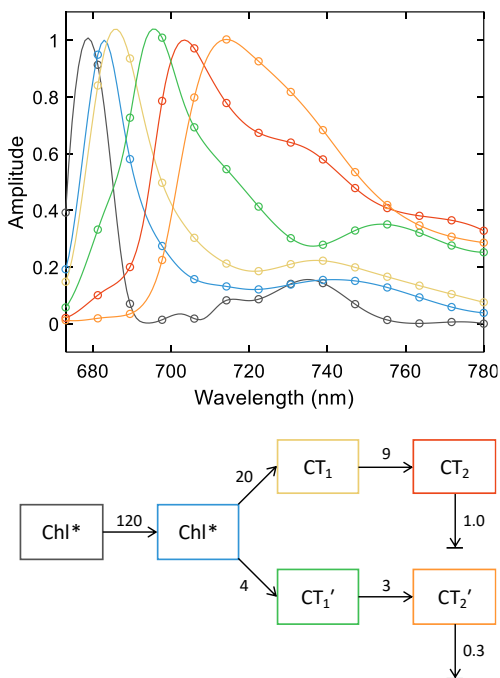


Figure 3. Kinetic modelling of the time-resolved fluorescence of LHCII aggregates at 77 K - species-associated emission spectra and kinetic model scheme with transfer rate constants in ns^{-1} .

c. With the help of the novel method of Chl fluorescence induction spectroscopy, we detected spectral signatures of the different kinetic components of non-photochemical quenching qE (rapidly reversible) and qZ or qI (sustained) in intact *Arabidopsis* leaves. The far-red fluorescence signature of charge-transfer-state quenching was found to coincide with the induction of qE and to be quantitatively correlated with the magnitude of qE but not with qI or qZ. These results strongly support the notion that 1) this physical mechanism is common to isolated LHCII as well as quenching in vivo and 2) that multiple quenching mechanisms act on different timescales in vivo.

3. Anisotropic CD spectroscopy helps identify excitonic transitions and validate structure-based exciton models.

a. The oriented CD or anisotropic CD (ACD) of macroscopically aligned pigment-protein complexes such as LHCII reveals additional information about their excited states that is lost in the CD of randomly oriented proteins in solution. ACD spectroscopy has the advantage of separating the optical transitions by the orientation of the underlying transition dipole moment,

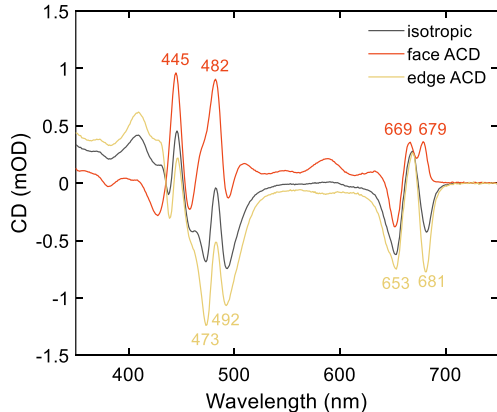


Figure 4. CD (isotropic) and ACD (face- and edge-aligned) spectra of LHCII membranes. The face- and edge-aligned ACD spectra effectively decompose the excitonic CD spectrum into bands originating from transitions parallel and perpendicular to the membrane plane.

in the case of oriented membrane proteins such as LHCII, it allows us to observe separately transitions oriented preferentially in and out of the membrane plane. The ACD spectra of LHCII (Figure 4) featured more intense, sharper bands in the visible region that markedly improve the ability to resolve pigment excitonic states.

b. Structure-based exciton calculations, aided by comparing the predicted and experimental optical spectra, provide the most detailed understanding of the photophysical function of the pigment-protein complexes. The ACD spectra potentially raise the fidelity and confidence of structure-based exciton models by additionally restricting the orientation of the modelled excitonic transitions. Calculations of the ACD spectra of LHCII using an exciton Hamiltonian proposed earlier reproduced the qualitative features of the experimental spectra in the Chl Q_y region. Moreover, it was demonstrated that the red-most ACD band is contributed by Chls of a604, a610 and a613, which comprise the lowest-energy exciton states.

4. Detailed knowledge of the dynamics of energy transfer between chlorophylls in LHCII has been obtained by two-dimensional electronic spectroscopy (2DES).

a. 2DES revealed different connected pools of Chl b and Chl a as well as simultaneous uphill and downhill energy transfer in the Chl a manifold. Exciton equilibration was found to occur on timescales up to about 5 ps at room temperature (Figure 5).

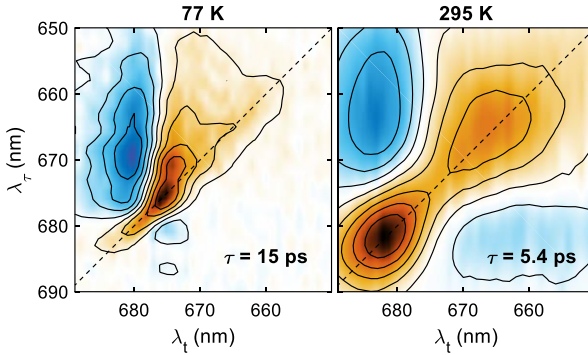


Figure 5. Two-dimensional decay-associated spectra showing the slowest resolved energy transfer components in LHCII at 77 and 295 K, with lifetimes of 15 and 5.4 ps, respectively. At low temperature, energy transfer is slower, mainly because of the smaller spectral overlap between donor and acceptor states. Furthermore, uphill energy transfer pathways are activated at room temperature, giving rise to the cross-peak below the diagonal line.

b. Energy transfer in LHCII is strongly temperature-dependent. The rate of equilibration with the terminal states slowed down by a factor of three at 77 K compared to room temperature. Static energetic disorder sets in at temperatures below the glass transition of the protein (< 230 K). Freezing protein motions blocked uphill energy transfer pathways following predictions from the detailed balance, which has a high impact on the overall energy transfer rate.

c. Phenomenological model fitting can extract sound physical parameters from the two-dimensional spectroscopy data, such as the excitonic state energies, homogeneous and inhomogeneous widths and microscopic rates of energy transfer. The spectro-kinetic model of LHCII (Figure 6) shows three terminal Chls states in LHCII weakly connected to each other and equilibration via bridging higher-energy excitonic states.

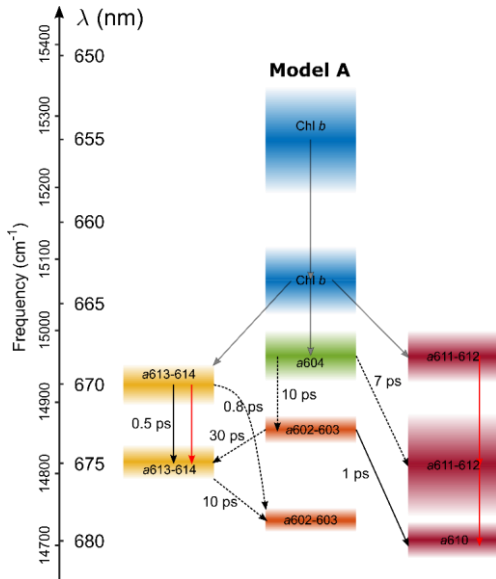


Figure 6. Model of EET in trimeric LHCII based on 2DES at 77 K. The colours of excitonic levels indicate strongly coupled domains, blue colour represents the Chl *b* manifold. Only downhill transfers are presented by the arrows.

5. LHCII is a spectrally tunable light-harvesting antenna.

a. The green syphonous alga *Bryopsis corticulans* has LHCII adapted for enhanced absorption of short-wavelength light by way of altered pigment composition. Two additional short-wavelength Chl states were identified at the expense of the longest-wavelength states. The broader absorption spectrum comes at the expense of slower energy transfer in the complex, which however does not negatively impact the photosynthetic efficiency. These results show that LHCII is a robust and tuneable system that can be adapted to the light environment while maintaining efficiency.

6. The rate of energy transfer between LHCII complexes largely determines the functional antenna size of photosystem II in thylakoid membranes.

- a. The functionally connected domains in LHCII aggregates, artificial and native membranes were determined to be limited to about 25 trimeric complexes. This number is in a good agreement with estimations of the size of the “photosynthetic unit” in terms of number of interconnected Chls.
- b. While it is possible to produce larger physical aggregates in vitro, the functional antenna size is limited mainly by the rate of energy transfer between LHCII complexes.

7. LHCII is an efficient antenna for both photosystems.

- a. In model membranes, LHCII can deliver absorbed energy to PSI thereby increasing the photosystem’s absorption cross-section. The time-scales of energy transfer indicate multiple binding sites. In this way the effective antenna size of the photosystem can be enhanced by 50% while the photochemical quantum yield remains near 90%. These results demonstrate the feasibility to construct efficient biohybrid systems with desired functional antenna sizes.

5. PUBLICATION RECORD OF THE DISSERTATION

1. Akhtar P, Do TN, Nowakowski PJ, Huerta-Viga A, Khyasudeen MF, Lambrev PH, Tan H-S (2019) Temperature dependence of the energy transfer in LHCII revealed by two-dimensional electronic spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry B* 123: 6765–6775
2. Akhtar P, Dorogi M, Pawlak K, Kovacs L, Bota A, Kiss T, Garab G, Lambrev PH (2015) Pigment interactions in light-harvesting complex II in different molecular environments. *J Biol Chem* 290: 4877–4886
3. Akhtar P, Görföl F, Garab G, Lambrev PH (2019) Dependence of chlorophyll fluorescence quenching on the lipid-to-protein ratio in reconstituted light-harvesting complex II membranes containing lipid labels. *Chemical Physics* 522: 242–248
4. Akhtar P, Lindorfer D, Lingvay M, Pawlak K, Zsiros O, Siligardi G, Jávorfí T, Dorogi M, Ughy B, Garab G, Renger T, Lambrev PH (2019) Anisotropic circular dichroism of light-harvesting complex II in oriented lipid bilayers: Theory meets experiment. *The Journal of Physical Chemistry B* 123: 1090–1098
5. Akhtar P, Lingvay M, Kiss T, Deák R, Bóta A, Ughy B, Garab G, Lambrev PH (2016) Excitation energy transfer between light-harvesting complex II and photosystem I in reconstituted membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1857: 462–472
6. Akhtar P, Nowakowski PJ, Wang W, Do TN, Zhao S, Siligardi G, Garab G, Shen J-R, Tan H-S, Lambrev PH (2020) Spectral tuning of light-harvesting complex II in the siphonous alga *Bryopsis corticulans* and its effect on energy transfer dynamics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1861: 148191
7. Akhtar P, Zhang C, Do TN, Garab G, Lambrev PH, Tan H-S (2017) Two-dimensional spectroscopy of chlorophyll a excited-state equilibration in light-harvesting complex II. *The Journal of Physical Chemistry Letters* 8: 257–263
8. Do TN, Huerta-Viga A, Akhtar P, Nguyen HL, Nowakowski PJ, Khyasudeen MF, Lambrev PH, Tan H-S (2019) Revealing the excitation energy transfer network of

- Light-Harvesting Complex II by a phenomenological analysis of two-dimensional electronic spectra at 77 K. *The Journal of Chemical Physics* 151: 205101
9. Enriquez MM, Akhtar P, Zhang C, Garab G, Lambrev PH, Tan HS (2015) Energy transfer dynamics in trimers and aggregates of light-harvesting complex II probed by 2D electronic spectroscopy. *J. Chem. Phys.* 142: 212432
 10. Lambrev PH, Miloslavina Y, Jahns P, Holzwarth AR (2012) On the relationship between non-photochemical quenching and photoprotection of photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1817: 760–769
 11. Lambrev PH, Nilkens M, Miloslavina Y, Jahns P, Holzwarth AR (2010) Kinetic and spectral resolution of multiple nonphotochemical quenching components in *Arabidopsis* leaves. *Plant Physiol.* 152: 1611–1624
 12. Lambrev PH, Schmitt FJ, Kussin S, Schoengen M, Várkonyi Z, Eichler HJ, Garab G, Renger G (2011) Functional domain size in aggregates of light-harvesting complex II and thylakoid membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1807: 1022–1031
 13. Miloslavina Y, Lambrev PH, Jávorfí T, Várkonyi Z, Karlický V, Wall JS, Hind G, Garab G (2012) Anisotropic circular dichroism signatures of oriented thylakoid membranes and lamellar aggregates of LHCII. *Photosynthesis Research* 111: 29–39
 14. Ostroumov EE, Gotze JP, Reus M, Lambrev PH, Holzwarth AR (2020) Characterization of fluorescent chlorophyll charge-transfer states as intermediates in the excited state quenching of light-harvesting complex II. *Photosynthesis Research* 144: 171–193
 15. Tutkus M, Akhtar P, Chmeliov J, Görföl F, Trinkunas G, Lambrev PH, Valkunas L (2018) Fluorescence Microscopy of Single Liposomes with Incorporated Pigment–Proteins. *Langmuir* 34: 14410–14418
 16. Wells KL, Lambrev PH, Zhang ZY, Garab G, Tan HS (2014) Pathways of energy transfer in LHCII revealed by room-temperature 2D electronic spectroscopy. *Physical Chemistry Chemical Physics* 16: 11640–11646