

# *Enhancing Photosynthesis*

## **Executive Summary**

La fotosintesi ossigenica è il motore che ha mosso l'evoluzione del nostro pianeta e ogni giorno produce cibo, energia e l'ossigeno che respiriamo. L'equilibrio ambientale dipende dalla fotosintesi, il solo fenomeno in grado di riequilibrare l'eccesso di anidride carbonica (CO<sub>2</sub>) prodotto dall'uso di combustibili fossili nell'ultimo secolo di sviluppo industriale e civile. Ciò è possibile perché un terzo della produzione fotosintetica globale è controllata dall'uomo nei campi coltivati. Ma non solo, la fotosintesi artificiale realizzata in dispositivi di ultima generazione per la produzione di combustibili solari, offre una risposta urgente alla necessità di fonti di energia rinnovabile.

Il programma finanziato con il 70% del premio Lombardia affronterà il nodo principale della efficienza fotosintetica sia in ambiente naturale che artificiale dando un nuovo impulso alla ricerca fondamentale sui meccanismi della fotosintesi, intesa nella accezione più ampia di sfruttamento dell'energia solare, per garantire in futuro uno sviluppo sostenibile, pulito e neutro quanto a emissioni di CO<sub>2</sub>. I laboratori lombardi che partecipano all'impresa, in stretto contatto con i tre scienziati premiati in questa edizione del premio Lombardia, studieranno soluzioni innovative per rendere la fotosintesi più efficiente, chiarendo i meccanismi fondamentali e sviluppando alternative artificiali attraverso una ricerca focalizzata sui materiali fotosintetici e i dispositivi fotocatalitici. Sarà uno sforzo unitario e interdisciplinare che affronterà l'interazione luce-materia fondendo la nuova frontiera della biologia sintetica con i metodi della biofisica, creando nuovi materiali e nuovi dispositivi nanotecnologici per l'energia pulita.

Il progetto prevede il coinvolgimento dei seguenti Centri di Ricerca:

1. Università degli Studi di Milano, Dipartimento di Bioscienze, gruppo di ricerca "*PhotoLab*" diretto da Paolo Pesaresi (UNIMI).
2. Università degli Studi di Milano Bicocca, Dipartimento di Scienza dei Materiali, gruppo di ricerca "*PorousMat Lab*" diretto da Silvia Bracco (UNIMIB).
3. Università di Pavia, Dipartimento di Biologia e Biotecnologie, gruppo di ricerca "*Plant PhotoLab*", diretto da Alberta Pinnola (UNIPV).
4. Politecnico di Milano Dipartimento di Fisica, gruppo di ricerca "*FemtoLab*" coordinato da Margherita Maiuri (POLIMI).
5. Consiglio Nazionale delle Ricerche, "*Photosynthesis Research Unit*" coordinato da Stefano Santabarba (CNR).

## Contesto e Motivazioni

Una delle sfide più urgenti per le biotecnologie vegetali è quella di trovare il modo di aumentare la produzione di granella per la nutrizione umana e l'alimentazione degli animali da allevamento (Ort et al. 2015; Long et al. 2015). Questa sfida richiede lo sviluppo di colture con una maggiore resa e in grado di mitigare gli effetti del cambiamento climatico.

Durante la rivoluzione verde, il potenziale di rendimento delle principali colture di cereali è stato aumentato principalmente incrementando l'indice di raccolta (HI – *Harvest Index*), che ora è superiore a 0,5 e vicino al limite biologico. Pertanto, si devono esplorare altri tratti fenotipici per aumentare ulteriormente il potenziale di rendimento delle colture. La modulazione della fotosintesi e l'ottimizzazione dell'efficienza di conversione dell'energia solare (ECE) sono state studiate meno estesamente durante la rivoluzione verde, e offrono ancora un significativo margine di miglioramento delle colture (Long et al. 2015; Furbank, Quick & Sirault 2015; Slattery & Ort 2021). È stato stimato che i livelli attualmente raggiungibili di ECE (definito come la frazione di radiazione assorbita convertita in biomassa) sono equivalenti a meno della metà del massimo teorico (Slattery & Ort 2015; Slattery & Ort 2021), e diverse strategie biotecnologiche per aumentare l'efficienza di questo processo sono già state identificate.

Inoltre, le piante non utilizzano tutta l'energia solare assorbita per promuovere la fotosintesi. Anzi, in condizione di eccesso di luce si ha la saturazione della fotosintesi e la produzione di Specie Reattive dell'Ossigeno (ROS) che possono ossidare lipidi, pigmenti, proteine (Tardy & Havaux 1996; Formaggio et al. 2001) all'interno del cloroplasto e danneggiare l'apparato fotosintetico compromettendo, così, l'efficienza della fotosintesi. Le piante hanno evoluto dei meccanismi per proteggersi dall'eccesso di luce e uno dei più importanti è il Non-Photochemical Quenching (NPQ). Attraverso l'NPQ, le piante dissipano l'energia assorbita in eccesso sotto forma di calore. Oltre il 75% dei fotoni assorbiti dalle piante può essere dissipato attraverso l'NPQ. L'NPQ è, però, un meccanismo lento ad essere attivato e disattivato e non permette alle piante di essere tempestive nell'adeguarsi ai cambi di luminosità compromettendo la loro produttività (Müller et al. 2001). La modulazione del NPQ è possibile attraverso un approccio transgenico che consente un maggiore accumulo dei due enzimi responsabili del ciclo delle xantofille, la violaxantina deossidasi (VDE) e la zeaxantina eossidasi (ZEP), e della subunità PsbS del fotosistema II (PSII), consente un aumento della produzione di biomassa in tabacco di circa il 15% (Kromdijk et al., 2016).

Un'altra strategia applicabile si basa sullo sfruttamento di meccanismi di risposta agli stress abiotici (basati su NPQ) presenti nei precursori ancestrali delle piante superiori. Un esempio di questa strategia è la recente (*unpublished*) re-introduzione della proteina antenna LHCSR di muschio (*Physcomitrella patens*) in *Arabidopsis thaliana* con conseguente incremento della biomassa prodotta. La conoscenza di base di questi sistemi molecolari rappresenta un elemento essenziale per il loro sfruttamento biotecnologico. In particolare, l'accurata descrizione dei meccanismi mediante i quali gli enzimi del ciclo delle xantofille modificano i loro substrati, e analogamente i determinanti molecolari alla base del legame dei diversi cromofori (clorofille e carotenoidi) nei sistemi antenna costituiscono informazioni fondamentali per l'ottimizzazione

delle rese e per garantire il passaggio da esperimenti *proof-of-principle* su scala di laboratorio ad effettiva applicazione in campo.

Oltre alla modulazione della capacità complessiva di assorbimento della luce, e di regolazione dell'efficienza di trasferimento dello stato eccitato ai cromofori dove i processi di foto-conversione hanno luogo (i centri di reazione, RC), l'efficienza complessiva delle reazioni luminose della fotosintesi è anche legata ai processi fotochimici stessi, e quindi alla reazione fotochimica primaria e sua successiva stabilizzazione attraverso la cascata ossidoriduttiva di trasferimento di elettroni. In condizioni ottimali sia il fotosistema I (PSI) che il fotosistema II (PSII) hanno rese di foto-conversione molto elevate, stimate in >0.95 per PSI e 0.80-0.85 per PSII (**Croce & van Amerongen et al. 2013; Caffarri et al. 2014**). Questo li rende degli ideali sistemi modello per lo sviluppo di materiali biomimetici, specialmente quando accoppiati a sistemi di raccolta della luce di grandi dimensioni. Questo è specialmente il caso del PSI, non solo per più alta resa quantica di foto-conversione che sfiora l'unità, ma anche per il fatto che questa sia mantenuta pressoché inalterata anche quando le dimensioni assolute e/o la banda spettrale dell'antenna è estesa nel vicini infrarosso. D'altro canto mentre il PSI opera a potenziali ossidoriduttivi tendenzialmente molto riducenti (tra -1.2 e -0.5 V, e.g. **Brettel 1997, Santabarbara et al. 2005**), il PSII al contrario contiene alcune delle specie ossidanti più forti presenti in natura (circa +1.2 V) necessarie per sostenere il processo di scissione dell'acqua (e.g. **Diner & Rappaport 2002, Lubitz et al. 2019**). Per cui dal punto di vista di reattività chimica i due fotosistemi sono molto diversi, ed entrambi interessanti, in termini di biocatalisi naturale e biomimetica artificiale, in dipendenza del prodotto, o gamma di prodotti, che si desidera ottenere. Il fatto di operare a potenziali molto riducenti in un caso, e ossidanti nell'altro, pone però dei problemi alla funzione dei fotosistemi in condizioni non ideali, ovvero quando limitati dagli accettori/donatori della catena di trasporto fotosintetico. In queste condizioni, che in genere coincidono con luci saturanti per il trasporto, o altrimenti con condizioni di sbilancio del metabolismo cloroplastico e/o cellulare, l'accumulo di specie attive redox prodotte dalle reazioni fotochimiche e successivo trasporto di elettroni può dare luogo alla produzione di diversi ROS, sia per interazione diretta coi centri redox (e.g. superossido, nel PSI) o, più indirettamente, per produzione di stati derivanti da processi di ricombinazione delle coppie di cariche separate, come la produzione di ossigeno singoletto nel PSI, da parte del tripletto del donatore primario P680. La reattività chimica dei cromofori che compongono il centro di reazione è fortemente modulata dall'interazione con le proteine che li coordinano (e.g. **Kharkats & Krishtalik 1985; Moser et al 1992; Mertz & Krishtalik 2000; Torres et al. 2003; Hasegawa & Noguchi 2005; Karyagina et al. 2007; Ptushenko et al. 2008; Saito et al. 2012a,b**). Grazie ai modelli strutturali ad alta risoluzione ora disponibile per entrambi i fotosistemi (e.g. **Jordan et al. 2001, Umena et al. 2011**) è quindi possibile identificare e, su questa base, modificare le proprietà dei cofattori mediante tecniche di biologia molecolare. Questi approcci sono generalmente implementati in alghe verdi e cianobatteri, che sono più agevoli da manipolare geneticamente, e in caso di un effetto molto penalizzante della mutazione possono essere cresciuti non fotosinteticamente su fonti arricchite di carbonio.

Analizzare i meccanismi attraverso cui le proteine modificano le caratteristiche di reattività dei cofattori, agendo, fondamentalmente, come dei solventi non isotropi, è di basilare interesse sia per approfondire ulteriormente i meccanismi di regolazione mediati dall'interazione proteina-

cofattore, nelle reazioni produttive della fotosintesi naturale, e quelle improduttive e potenzialmente dannose, come la ricombinazione di carica, sia per trasferire le informazioni nel disegno completamente artificiale, sia su base organica/metallorganica, sia di biologia sintetica. Tutte le informazioni ottenute dai sistemi antenna e dai centri di reazione della fotosintesi naturale possono essere sfruttate non solo per migliorare la fotosintesi naturale ma anche per modellare la fotosintesi artificiale. Infatti, progettare materiali di natura sintetica che possano utilizzare la luce per realizzare reazioni come la scissione dell' $\text{H}_2\text{O}$  o la riduzione della  $\text{CO}_2$  è vitale per fornire un metodo alternativo e sostenibile di produzione dell'energia. Nella fotosintesi artificiale, l'energia solare viene catturata e l'acqua e la  $\text{CO}_2$  vengono ridotte a combustibili chimici insieme all'ossidazione dell'acqua in  $\text{O}_2$ . La fotosintesi artificiale può quindi non soltanto diminuire la quantità di  $\text{CO}_2$  nell'atmosfera, ma anche produrre combustibili ad alta densità energetica comodi da trasportare e immagazzinare, in grado di restituire energia in modo flessibile e delocalizzato, esente da emissioni di carbonio. Un sistema di fotosintesi artificiale dovrebbe includere in una singola architettura componenti fotosensibili per la cattura della luce e catalizzatori per l'ossidazione dell'acqua e la riduzione della  $\text{CO}_2$ . Però, ad oggi è ancora una sfida fabbricare un tale sistema per la difficoltà di integrare specie catalitiche multifunzionali in un unico dispositivo (**Tachibana et al. 2012; Berardi et al. 2014**). Gli sforzi fatti finora sono stati infatti dedicati allo sviluppo dei singoli sistemi fotocatalitici per le reazioni separate di produzione di idrogeno, conversione della  $\text{CO}_2$  e ossidazione dell'acqua (**Liang et al. 2018; Whelan et al. 2021**). I Metal Organic Frameworks (MOFs), materiali cristallini porosi ibridi organici-inorganici, hanno suscitato grande interesse nell'ultimo decennio per la conversione di energia e per l'ossidazione dell'acqua. Oltre alla grande varietà di strutture e dimensioni dei pori (**Jeoung et al. 2020; Aulakh et al. 2018**), i MOFs offrono un grande vantaggio rispetto ad altri materiali porosi inorganici convenzionali, come le zeoliti, in quanto le loro proprietà possano essere regolate per applicazioni specifiche variando la natura dei linker e degli ioni metallici nella struttura (**Wasson et al. 2019**). Inoltre, la porosità permanente dei MOF consente l'inclusione di varie molecole ospiti, che possono influenzare le proprietà dei materiali (**Ullman et al. 2016; Perego et al. 2020**). La versatilità chimica e strutturale di questi materiali, nonché le loro aree superficiali potenzialmente elevate e la porosità permanente, hanno facilitato la loro applicazione come catalizzatori (**Baek et al. 2018; Li et al. 2016**), come materiali per lo stoccaggio e la separazione di gas (**Lin et al. 2021**), come sensori per prodotti chimici (**Gao et al. 2017**), come cristalli fotoluminescenti (**Perego et al. 2021**) e per il *drug delivery* (**Horcajada et al. 2010**). I MOFs possono quindi essere personalizzati e indirizzati verso applicazioni fotocatalitiche mediante l'incorporazione di componenti appropriate nell'architettura porosa (**Han et al. 2018; Ryu et al. 2017**), sfruttando i seguenti vantaggi: (1) le proprietà di assorbimento della luce dei MOFs possono essere ben modulate attraverso l'introduzione di cromofori organici, leganti poliaromatici, gruppi funzionali come gruppi amminici e porfirinici; (2) I MOFs possono fungere da substrati o *host* per l'incorporazione di complessi molecolari fotocataliticamente attivi, generando foto-catalizzatori eterogenei con riciclabilità e stabilità desiderabili; (3) la struttura dei pori ben definita dei MOFs può garantire la monodispersione dei componenti attivi, prevenendone la decomposizione e la disattivazione; (4) l'elevata area superficiale e la porosità assicurano l'intimo contatto tra la struttura porosa e i componenti attivi incorporati come nanoparticelle e complessi, portando a un'efficiente separazione di carica e trasferimento di elettroni; (5) l'incorporazione di più di un componente attivo in un singolo

cristallo MOF consente di realizzare sistemi compositi multifunzionali in cui gli effetti sinergici delle componenti incorporate possono migliorare l'efficienza del processo fotocatalitico. I Porous Organic Polymers (POPs), ed in particolare i Conjugated Porous Polymers (CPPs), rappresentano un'altra tipologia di materiali porosi potenzialmente utilizzabili per la conversione dell'energia solare. Questi materiali sono costituiti da unità interamente organiche e non contengono metalli nella loro struttura. Mostrano una migliore efficienza nella cattura della luce e proprietà di conduzione di carica per l'estesa coniugazione del sistema  $\pi$ , un'elevata area superficiale e un'alta stabilità termica e chimica che li rendono ideali per applicazioni fotocatalitiche (Barawi et al. 2021).

## Descrizione degli obiettivi del progetto

La trasversalità del presente progetto rappresenta uno dei punti di forza che permetterà di realizzare uno degli obiettivi strategici richiesti dal Premio Lombardia è Ricerca ai propri vincitori, ovvero la **creazione di un network di ricerca multidisciplinare sulla tematica del miglioramento della fotosintesi naturale e artificiale**.

In questo contesto i proponenti beneficiari puntano a consolidare le relazioni professionali che consentiranno l'ottenimento degli obiettivi scientifici primari descritti di seguito, ma anche tutte quelle sinergie che consentiranno al partenariato venutosi a costituire la possibilità di espandere gli argomenti di investigazione partecipando a nuove call su tematiche in linea con le competenze a disposizione. Il progetto si promette inoltre di stabilire una piattaforma/hub di spettroscopia ottica, che rappresenta uno dei metodi di elezione per lo studio dei processi fotosintetici. La struttura sarà basata sulle strumentazioni già esistenti nei laboratori coinvolti ed ampliato durante l'arco del progetto per scopi specifici, in modo da coprire un ampio arco spettro-temporale ed adattabilità a complessi di diversa natura, sia biologica che artificiale/sintetica. L'idea è che oltre a favorire l'interazione tra i ricercatori durante il progetto, fungendo da punto congiunto per l'analisi e studio dei campioni, questa possa mantenersi funzionale anche al termine del progetto, così da rafforzare le interazioni e aumentare la competitività di progetti presentati a bandi futuri, e altresì essere aperta ad altri ricercatori in questo settore di ricerca, fungendo, ci si augura, da punto di aggregazione scientifico, metodologico e tecnologico di lungo periodo.

A tal fine, cruciali saranno i momenti di confronto e condivisione durante lo sviluppo progettuale e al termine di esso. In particolare, è intenzione dei proponenti beneficiari mantenere costanti contatti e momenti di confronto attraverso *conference call* e incontri in presenza (non necessariamente coinvolgenti l'intero partenariato), e di organizzare un simposio al termine del presente progetto aperto alla comunità scientifica internazionale per valorizzare ulteriormente le esperienze acquisite e facilitare le interazioni con ulteriori partners e la nascita di nuove. La sede di tale simposio sarà stabilita dai proponenti durante lo sviluppo progettuale. Analogamente è interesse del partenariato stimolare e animare su territorio lombardo la ricerca su tematiche *green* e legate al miglioramento della fotosintesi. Pertanto, a seconda dello stato di avanzamento delle attività nei singoli laboratori verranno organizzate occasioni di

disseminazione scientifica e divulgazione tramite comunicati stampa, incontri con le scuole e/o eventi di divulgazione scientifica in presenza anche in concomitanza di grandi occasioni di *public engagement* già strutturate all'interno degli istituti di appartenenza (ad esempio, Notte dei ricercatori, *European Biotech week*, *Meet-Me-Tonight* e *Fascination of Plant Day*).

Accanto a questo primo fondamentale obiettivo, di natura trasversale, verranno perseguiti i seguenti obiettivi specifici.

## **Obiettivo 1: Investigare i meccanismi di funzionamento di complessi fotosintetici per il design di Complessi Artificiali Biomimetici**

Realizzare dispositivi molecolari artificiali in grado di raccogliere in modo efficiente la luce solare per la generazione diretta di energia (approccio fotovoltaico) o la produzione di carburante (approccio fotosintetico) è la risposta all'esigenza di utilizzare energia solare. Per quanto riguarda il secondo approccio, l'efficienza quantica della fotosintesi naturale è stata a lungo ammirata dai ricercatori che sviluppano tecnologie di raccolta della luce solare. Pertanto, le strategie future dovrebbero mirare ad imitare i complessi di raccolta della luce (o *light harvesting*, LH) e centri di reazione (RC) naturali, supportate dall'argomento che, se riusciamo a capire come piante e batteri siano così efficienti nel convertire i fotoni assorbiti in cariche, potremmo essere in grado di utilizzare principi di *design* simili in materiali e dispositivi per la generazione di energia solare.

Il primo obiettivo del progetto è quindi quello di studiare i meccanismi molecolari di raccolta della luce in complessi naturali e ottimizzarli per sistemi LH/RC artificiali sfruttando un approccio sperimentale. La spettroscopia ultraveloce svelerà le dinamiche dei processi di trasferimento di energia e di carica fotoindotti e l'interazione tra i ruoli di fenomeni di coerenza elettronica e vibrazionale nei complessi LH/RC, che sono determinate in grande misura dall'interazione proteina-cofattore: tecniche avanzate di spettroscopia coerente multidimensionale (come il *pump-probe* o la spettroscopia elettronica bidimensionale, 2DES disponibili presso l'unità POLIMI) tratterà i processi di trasferimento di carica e di stato eccitato coinvolti nella reazione di raccolta e conversione della luce, assegnando le specifiche correlazioni elettroniche. La natura delle interazioni verrà studiata anche modificando selettivamente i residui proteici coinvolti nella coordinazione (sito di legame) di specifici cofattori sia in sistemi LH che RC. Gli esperimenti 2DES ad alta risoluzione temporale (sub10fs) e copertura spettrale dal visibile all'infrarosso saranno eseguiti su campioni controllati di sistemi LH/RC sia naturali (da piante e cianobatteri) che artificiali (materiali MOFs e POPs).

Questi studi ci consentiranno di chiarire i meccanismi molecolari e il ruolo svolto dalle coerenze quantistiche nei processi LH/RC, e la loro relazione con le proprietà strutturali ed elettroniche dei sistemi naturali, aprendo così la strada alla progettazione di materiali artificiali attraverso strategie di ispirazione biomimetica che potrebbero, se compatibili, includere l'utilizzo di nanodischi lipidici (sviluppati in collaborazione con UNIPV).

## **Obiettivo 2: Analisi dei meccanismi molecolari dell'attivazione dell'NPQ per migliorare l'efficienza fotosintetica e la produttività delle piante**

Il “*Plant PhotoLab*” di UNIPV ha sviluppato e recentemente ulteriormente utilizzato strategie per la produzione eterologa di ZEP e di LHCSR di *P. patens* utilizzando rispettivamente *E. coli* e tilacoidi di *N. benthamiana* come *host* per la loro produzione. Le tecnologie di purificazione si basano sull'estrazione delle proteine di membrana utilizzando miscele di detergenti, la ricostituzione di sistemi *membrane-like* mediante nanodischi lipidici, la purificazione fino ad omogeneità mediante una combinazione di ultracentrifugazione in gradiente di saccarosio e sfruttamento di *tag* di affinità inseriti nelle sequenze amminoacidiche delle proteine ricombinanti.

In questo progetto proponiamo di sfruttare queste tecnologie per:

- I. generare una libreria di mutanti di LHCSR su siti critici per il processo di NPQ.
- II. produrre i mutanti di LHCSR e le tre isoforme di ZEP in forma ricombinante sfruttando le metodiche già in uso in laboratorio.
- III. caratterizzare sotto il profilo biochimico-strutturale, utilizzando metodiche sperimentali e/o computazionali e in collaborazione con UNIMI, l'architettura molecolare e i meccanismi enzimatici di almeno una delle tre isoforme di ZEP presenti in *P. patens*.
- IV. analizzare in collaborazione con CNR e PoliMi le caratteristiche biofisiche di ciascun mutante di LHCSR per identificare i siti critici per il funzionamento della risposta NPQ.
- V. ricostituire *in-vitro* in sistemi ricombinanti (piante di *A. thaliana* trasformate stabilmente) le migliori varianti di ZEP e LHCSR per avviarle ad una successiva caratterizzazione fenotipica approfondita. Questa attività verrà sviluppata in collaborazione con UNIMI.

## **Obiettivo 3: Esplorare la variabilità genetica disponibile in orzo per migliorare la capacità fotosintetica e la produttività**

Nell'ambito di questo progetto intendiamo rendere più rapido il meccanismo foto-protettivo NPQ in orzo (*Hordeum vulgare*), che sarà qui utilizzato come modello anche per altre specie cerealicole, attraverso un approccio non-transgenico e quindi diverso da quello già utilizzato in **Kromdijk et al. (2016)**. A tale scopo, utilizzeremo varianti alleliche degli enzimi VDE e ZEP (6 in totale), precedentemente identificate all'interno di popolazioni di mutanti di orzo ottenute per mutagenesi chimica, e già disponibili presso il gruppo *PhotoLab*. Queste varianti alleliche sono caratterizzate da singole sostituzioni amminoacidiche all'interno dei domini funzionali degli enzimi VDE e ZEP. Dati preliminari indicano, inoltre, che queste varianti enzimatiche accumulano nelle stesse quantità degli enzimi selvatici, mentre mostrano cinetiche molto diverse nell'attivazione e inattivazione del processo foto-protettivo NPQ. Nello specifico ci occuperemo in collaborazione con gli altri *partners* del progetto di:

- VI. Caratterizzare a livello biochimico e biofisico le diverse linee di orzo, ciascuna recante una variante enzimatica;
- VII. Esprimere alcune delle varianti enzimatiche in *E. coli*, attraverso la tecnologia del DNA ricombinante, e valutare attraverso saggi *in vitro*, le loro proprietà enzimatiche;
- VIII. Valutare la *performance* di queste 6 linee di orzo in condizioni di campo, monitorando la produzione totale di biomassa e di granella;
- IX. Combinare attraverso incrocio le linee, che sulla base dei dati sperimentali ottenuti, potranno rendere il processo NPQ adattabile più rapidamente alle diverse condizioni luminose presenti nell'ambiente.

#### **Obiettivo 4: Design e realizzazione di architetture porose come sistemi mimetici della fotosintesi naturale**

L'attività di ricerca del *PorousMat Lab* (UNIMIB) è in generale incentrata sulla progettazione, sintesi e caratterizzazione di nuove architetture nanoporose ad alta area superficiale per l'immagazzinamento e l'adsorbimento selettivo di gas e per ottenere materiali polifunzionali. Le strategie di sintesi ottimizzate negli ultimi anni e la strumentazione avanzata, dedicata alla caratterizzazione di tali materiali, verranno applicate nel progetto "*Enhancing Photosynthesis*" con l'obiettivo di creare strutture artificiali complesse in grado di interagire con la luce e di ospitare centri di reazione per studiare i fenomeni di energy transfer ed electron transfer in sistemi artificiali. L'attività verrà condotta in stretta collaborazione con le altre unità e si articolerà nei seguenti sei punti:

I. Sintesi di molecole (leganti) poliaromatiche funzionalizzate, che assorbano nel visibile e che possano, una volta inserite nell'architettura del materiale, manifestare la funzione di antenna. I leganti verranno studiati in collaborazione con POLIMI e CNR.

II. Creazione di materiali cristallini porosi via auto-assemblaggio dei leganti con ioni metallici o cluster metallici.

III. Sintesi dei polimeri organici porosi a partire dalle molecole poliaromatiche sintetizzate al punto 1 e modificate chimicamente per poter effettuare reazioni di accoppiamento di Yamamoto.

IV. Caratterizzazione delle strutture, della porosità, della stabilità termica e chimica dei materiali ottenuti. I materiali verranno studiati in collaborazione con POLIMI e CNR.

V. Creazione di centri di reazione per diffusione di componenti attive nelle strutture porose. Le strutture complesse verranno studiate in collaborazione con POLIMI e CNR.

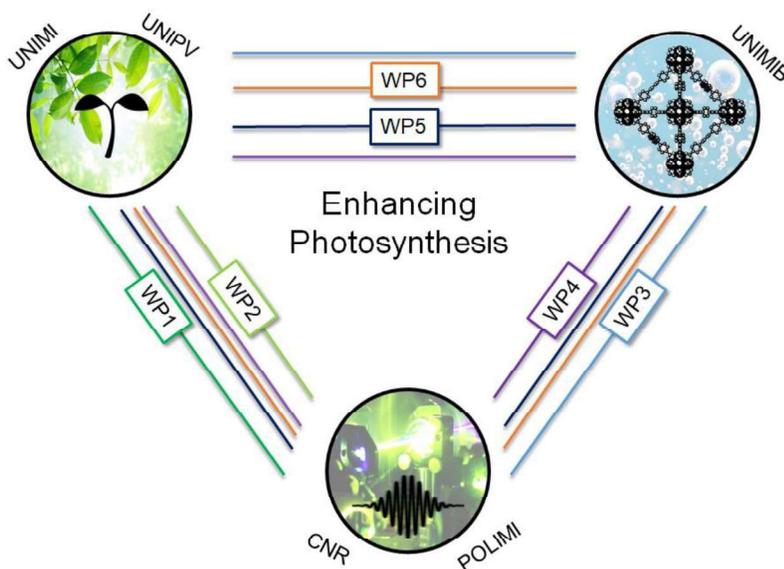
VI. Dispersione delle nanostrutture fotoattive in strutture lipidiche (nanodischi) in collaborazione con UNIPV.

## Organizzazione delle attività di ricerca e crono-programma

Il progetto “*Enhancing Photosynthesis*” riunisce gruppi di ricerca con competenze e infrastrutture complementari di 3 Università lombarde, il Politecnico di Milano e il CNR. Nello specifico, le competenze del gruppo coordinato da Paolo Pesaresi (Dipartimento di Bioscienze, Università degli Studi di Milano -UNIMI) nell’ambito della genomica funzionale della fotosintesi in *A. thaliana* e orzo e di Alberta Pinnola (Dipartimento di Biologia e Biotecnologie dell’Università di Pavia -UNIPV) relative ai meccanismi di fotoprotezione, di regolazione della fotosintesi, e dei sistemi antenna dei fotosistemi consentiranno di approfondire le conoscenze dei meccanismi fotoprotettivi in organismi modello e di utilizzare queste conoscenze per mettere a punto strategie biotecnologiche per migliorare l’efficienza fotosintetica di specie di interesse agronomico tra cui l’orzo. La caratterizzazione di mutanti e dei complessi proteici oggetto degli studi si avvarrà delle competenze del gruppo coordinato da Margherita Maiuri (Dipartimento di Fisica del Politecnico di Milano – POLIMI) esperta di tecniche di spettroscopia ottica risolta in tempo per lo studio dei meccanismi fotoindotti di sistemi fotosintetici naturali e complessi artificiali e di Stefano Santabarbara (Consiglio Nazionale delle Ricerche - CNR) che vanta una lunga esperienza nell’analisi del trasferimento di elettroni e di energia in sistemi fotosintetici naturali. La progettazione e realizzazione di materiali nanoporosi fotoattivi di natura artificiale verrà realizzata nel gruppo di ricerca coordinato da Silvia Bracco (Università degli Studi di Milano-Bicocca - UNIMIB), che vanta un’esperienza ormai consolidata nell’ambito della preparazione di materiali nanostrutturati porosi per lo stoccaggio e l’adsorbimento selettivo di gas (CO<sub>2</sub>, Xe, H<sub>2</sub> e CH<sub>4</sub>) e della creazione di strutture organometalliche fluorescenti e polimeri organici porosi con elementi foto-responsivi.

Il progetto “*Enhancing Photosynthesis*” ha una durata di 24 mesi ed è organizzato in sei “*workpackages*” (WP) interconnessi (Fig. 1) che formano la base di una ricerca multidisciplinare e integrata che copre lo studio sia dei meccanismi naturali che delle alternative artificiali che

emergono dalla ricerca di frontiera sui materiali fotosintetici e i dispositivi fotocatalitici.



**Figura 1:** Rappresentazione schematica dei 6 WP che caratterizzano il progetto “*Enhancing Photosynthesis*” e loro interazioni.

Più in dettaglio il WP1, coordinato da Alberta Pinnola (UNIPV) avrà il compito di studiare i meccanismi molecolari coinvolti nell'attivazione dell'NPQ in *P. patens* per migliorare l'efficienza fotosintetica e la produttività delle piante. Questo obiettivo sarà perseguito studiando le proteine LHCSR e ZEP di muschio. In una fase iniziale verranno eseguiti studi *in silico* necessari per la creazione di mutanti di queste due proteine. Successivamente si procederà con la produzione ricombinante dei mutanti di LHCSR e ZEP: per quanto riguarda la ZEP verrà effettuata una caratterizzazione biochimico-strutturale mentre per LHCSR si procederà ad una caratterizzazione spettroscopica e biofisica dei mutanti prodotti e purificati; queste misure permetteranno l'identificazione dei siti critici di LHCSR per il funzionamento della risposta NPQ. I mutanti più performanti di ZEP e LHCSR verranno inseriti in pianta e, successivamente, verrà analizzata l'efficienza fotosintetica e la produttività. Quest'ultima parte per sua natura raggiungerà la sua conclusione quasi sicuramente dopo il termine di questo progetto. Per questo il *deliverable* atteso in relazione a questo WP è a livello di *proof of principle*. Risultati che comunque costituiscono un traguardo significativo nella messa a punto di sistemi di ottimizzazione della fotosintesi sfruttando proteine provenienti da organismi ancestrali.

Il WP2, coordinato da Paolo Pesaresi (UNIMI) utilizzerà invece l'orzo come specie modello per rendere più rapida la cinetica del NPQ e quindi incrementare l'efficienza fotosintetica e la produzione di biomassa. Questo obiettivo sarà perseguito sfruttando la variabilità genetica naturale e indotta disponibile in orzo per i geni VDE e ZEP. Dopo aver analizzato le diverse varianti alleliche per i geni che codificano gli enzimi VDE e ZEP a livello biochimico, biofisico e in merito alla loro capacità produttiva in campo, le linee con le migliori performance saranno incrociate per combinare le varianti alleliche in grado di migliorare la capacità dell'orzo di adattarsi ai rapidi cambiamenti dell'intensità luminosa nell'ambiente.

Il WP3, coordinato da Silvia Bracco (UNIMIB), ha l'obiettivo di incorporare in nanocristalli e nanoparticelle, altamente permeabili ai gas, accettori di luce e catalizzatori allo scopo di ottenere le stesse trasformazioni chimiche *in situ* in strutture artificiali, come operato dai sistemi biologici fotoattivi. Nella prima fase del progetto l'attività sarà incentrata sulla sintesi di leganti poliaromatici funzionalizzati con proprietà di assorbimento nella regione del visibile (3.1). Queste molecole costituiranno i *building blocks* sia delle architetture porose tipo Metal Organic Frameworks (MOFs), sia dei Porous Organic Polymers (POs), che verranno realizzati in parallelo (3.2 e 3.3). La caratterizzazione strutturale e di adsorbimento di gas dei materiali ottenuti si sovrapporrà con l'attività di preparazione in modo da instaurare un processo iterativo di progettazione/preparazione che porti all'ottimizzazione della preparazione e delle proprietà del materiale (3.4). La successiva creazione di centri di reazione confinati nei nanocanali (3.5) consentirà lo studio dei fenomeni di *energy transfer* ed *electron transfer*. Le strutture più promettenti verranno disperse in strutture lipidiche a membrana (nanodischi), creando dei sistemi ibridi da sottoporre a prove comparative di attività fotosintetica (3.6).

WP4, coordinato da Margherita Maiuri (PoliMi), e che prevede una forte collaborazione con le altre unità, in particolare quella coordinata da Stefano Santabarbara (CNR), ha il fine di aumentare il livello di comprensione dei meccanismi attraverso i quali le proteine

modificano le reattività chimica e fotochimica dei centri di reazione fotosintetici e dei sistemi antenna. E' noto infatti che le clorofille, chimicamente identiche, che partecipano ai centri di reazione, operano a potenziali ossidoriduttivi molto diversi. La modulazione delle proprietà di queste molecole determina anche la velocità delle reazioni, sia fotochimiche che di trasferimento di elettroni. Per metodi di biologia molecolare è possibile introdurre mutazioni sito-specifiche (alterazioni di un singolo, o pochi aminoacidi) nell'intorno di specifici cofattori, che sono ora ben identificati nei modelli cristallografici. In questo modo le proprietà di reattività del cofattore di interesse sono modificate pressoché selettivamente, e gli effetti che esse producono sulle cinetiche di reazione, e sulla resa totale del processo, possono essere monitorate con appropriate tecniche spettroscopiche: spettroscopia di assorbimento TA, 2DES o fluorescenza TC-SPC/Streak camera, per le reazioni fotochimiche e di stabilizzazione, e ottica transiente con risoluzione sub-microsecondi per le successive reazioni di trasferimento di elettroni. Verranno in particolare modificati i siti di legame nell'intorno del donatore terminale del PSI (P700), della coppia accettrice (eC2/3) e dei centri Fe-S (FX e FA) nel cianobatterio modello *Synechocystis PCC6803* (e.g. per simili mutazioni in organismi modello: **Guergova-Kuras et al. 2001, Santabarbara et al. 2005, 2006; Li et al. 2006**). Ci si attende che, attraverso la combinazione di diverse tecniche spettroscopiche, in grado di fornire un'ampia gamma di informazioni complementari, sia sulle cinetiche di reazione che su specifici fattori, in particolare sui processi quantistici attivi in regimi ultraveloci, applicata anche a selettivamente modificate, sia possibile acquisire nuove informazioni, di natura generale, concernenti la modulazione dell'attività fotochimica dei cromofori da parte di solventi non-isotropi (proteine).

WP5, lo scopo è quello di realizzare una piattaforma unitaria, principalmente con partecipazione delle unità di ricerca coordinata da Stefano Santabarbara (CNR) e Margherita Maiuri (PoliMi), che sfruttando sia competenze che le strumentazioni già presenti, ne estenda la applicabilità a campioni biologici complessi, e a materiali potenzialmente altamente disperdenti (polvere amorfe) che sono in generale di difficile analisi, specialmente in regime ultraveloce. Si intende inoltre implementare un serie di metodologie a "moderata risoluzione temporale" (sub-microsecondi) sfruttando gli avanzamenti della tecnologia LED. Infatti molte reazioni sia di trasferimento di elettroni nei centri di reazione, che di trasporto, nelle membrane e materiale biologico intatto, avvengono su scale temporali che coprono i nano-, micro-millisecondi e oltre. La presenza di questa struttura di analisi consentirà inoltre di adattare i metodi presenti e inizialmente ipotizzati anche ad eventuali scopi specifici qualora emergano in corso d'opera. Inoltre, ci si attende che la struttura possa continuare la sua attività, congiunta, anche al termine formale del progetto e che possa in questo modo rappresentare un supporto di investigazione di lungo termine per la fotosintesi sia naturale che artificiale, esteso anche a tutta la comunità interessata a queste tematiche.

Il WP6, coordinato da Stefano Santabarbara (CNR) che è anche coordinatore dell'intero progetto, avrà il compito di gestire l'intero piano sperimentale, di organizzare e coordinare il piano di divulgazione dei risultati e di fare da intermediario con l'amministrazione di Regione Lombardia per gli aspetti economici-gestionali del progetto.

## Bibliografia

Aulakh, D.; Islamoglu, T.; Bagundes, V.F.; Varghese, J.R.; Duell, K.; Joy, M.; Teat, S.J.; Farha, O.K.; Wriedt, M. (2018) Rational Design of Pore Size and Functionality in a Series of Isoreticular Zwitterionic Metal–Organic Frameworks. *Chem. Mater.*, **30**, 8332–8342.

Baek, J.; Rungtaweevoranit, B.; Pei, X.; Park, M.; Fakra, S.C.; Liu, Y.-S.; Matheu, R.; Alshimri, S. A.; Alshehri, S.; Trickett, C.A.; Somorjai, G.A.; Yaghi, O.M. (2018) Bioinspired metal–organic framework catalysts for selective methane oxidation to methanol. *J. Am. Chem. Soc.*, **140**, 18208-18216.

Barawi, M.; Collado, L.; Gomez-Mendoza, M.; Oropeza, F. E.; Liras, M.; de la Peña O’Shea, V. A. (2021) Conjugated Porous Polymers: Ground-Breaking Materials for Solar Energy Conversion. *Adv. Energy Mater.*, 2101530.

Béal, D.; Rappaport, F.; Joliot, P. (1999) A new high-sensitivity 10-ns time-resolution spectrophotometric technique adapted to in vivo analysis of the photosynthetic apparatus. *Rev. Sci. Instrum.* **70**, 202–207.

Beechem, J.M., Gratton, E.; Ameloot, M.; Knutson, J.R.; Brand, L., in *Topics in Fluorescence Spectroscopy*, 2, ed. J. R. Lakowicz, Plenum Press, New York, USA, 1991, pp. 241–305.

Berardi, S.; Drouet, S.; Francas, L.; Gimbert-Surinach, C.; Guttentag, M.; Richmond, C.; Stoll, T.; Llobet, A. (2014) Molecular artificial photosynthesis. *Chem. Soc. Rev.*, **43**, 7501-7519.

Brettel, K., (1997) Electron transfer and arrangement of the redox cofactors in photosystem I. *Biochim. Biophys. Acta*, **1318**, 322-373.

Byrdin, M.; Santabarbara, S.; Gu, F.; Fairclough, W. V.; Heathcote, P.; Redding, K.; Rappaport, F. (2006) Assignment of a kinetic component to electron transfer between iron-sulfur clusters F(X) and F(A/B) of Photosystem I. *Biochim Biophys Acta*, **1757**, 1529-1538.

Caffarri, S.; Tibiletti, T.; Jennings, R.C.; Santabarbara, S. (2014) A Comparison between Plant Photosystem I and Photosystem II Architecture and Functioning. *Curr. Protein Pept.Sci.* **15**, 296–331.

Croce, R.; van Amerongen, H. (2013) Light-harvesting in Photosystem I. *Photosynth. Res.* **116**, 153–166.

Diner, B.A.; Rappaport, F. (2002) Structure, dynamics, and energetics of the primary photochemistry of photosystem II of oxygenic photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **53**, 551-580.

Formaggio E., Cinque G., & Bassi R. (2001). Functional architecture of the major light-harvesting complex from higher plants. *Journal of Molecular Biology*; **314**, 1157-1166.

Furbank R.T., Quick W.P. & Sirault X.R.R. (2015) Improving photosynthesis and yield potential in cereal crops by targeted genetic manipulation: Prospects, progress and challenges. *Field Crops Res.* **182**, 19–29.

Gao, M.-L.; Cao, X.-M.; Zhang, Y.-Y.; Qi, M.-H.; Wang, S.-M.; Liu, L.; Han, Z.-B. (2017) A bifunctional luminescent europium-organic framework for highly selective sensing of nitrobenzene and 4-aminophenol, *RSC Adv.* **7**, 45029-45033.

Guergova-Kuras ,M.; Boudreaux, B.; Joliot, A.; Joliot, P.; Redding, K. (2001) Evidence for two active branches for electron transfer in photosystem I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **98**, 4437–4442.

Han, S.-Y.; Pan, D.-L.; Chen, H.; Bu, X.-B.; Gao, Y.-X.; Gao, H.; Tian, Y.; Li, G.-S.; Wang, G.; Cao, S.-L.; Wan, C.-Q.; Guo, G.-C. (2018) A methylthio-functionalized-MOF photocatalyst with high performance for visible-light-driven H<sub>2</sub> evolution. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **57**, 9864-9869.

Hasegawa, K.; Noguchi, T. (2005) Density functional theory calculation on the dielectric-constant dependence of the oxidation potential of chlorophyll: Implication for the high potential of P680 in photosystem II. *Biochemistry*, **44**, 8865-8872.

Horcajada, P.; Chalati, T.; Serre, C.; Gillet, B.; Sebrie, C.; Baati, T.; Eubank, J. F.; Heurtaux, D.; Clayette, P.; Kreuz, C.; Chang, J.-S.; Hwang, Y. K.; Marsaud, V.; Bories, P.-N.; Cynober, L.; Gil, S.; Ferey, G.; Couvreur, P.; Gref, R.; (2010) Porous metal-organic-framework nanoscale carriers as a potential platform for drug delivery and imaging. *Nat. Mater.*, **9**, 172-178.

Jeoung, S.; Kim, S.; Kim, M.; Moon, H. R. (2020) Pore engineering of metal-organic frameworks with coordinating functionalities. *Coordinat. Chem. Rev.*, **420**, 213377.

Joliot, P.; Beal, D.; Frilley, B. (1980) Une nouvelle méthode spectrophotométrique destinée à l'étude des réactions photosynthétiques. *J. Chim. Phys.* **77**, 209-216.

Jordan, P.; Fromme, P.; Witt, H.T.; Klukas, O.; Saenger, W.; Krauss, N. (2001) Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution. *Nature*, **411**, 909-917.

Karyagina, I.; Pushkar, Y.; Stehlik, D.; van der Est, A.; Ishikita, H.; Knapp, E. W.; Jagannathan, B.; Agalarov, R.; Golbeck, J. H., (2007) Contributions of the protein environment to the midpoint potentials of the A1 phylloquinones and the Fx iron-sulfur cluster in photosystem I. *Biochemistry*, **46**, 10804-16.

Kharkats Y., Krishtalik L.I. (1985) Medium reorganization energy and enzymatic-reaction activation-energy. *J Theor Biol* **112**, 221-249.

Kromdijk J., Głowacka K., Leonelli L., Gabill S.T., Iwai M., Niyogi K.K., Long S. P. (2016) Improving photosynthesis and crop productivity by accelerating recovery from photoprotection. *Science* **54**, 857-861.

Landl, G.; Langthaler, T.; Engl, H.W.; Kauffmann, H.F. (1991) Distribution of event times in time-resolved fluorescence: The exponential series approach-algorithm, regularization, analysis. *J. Comp. Phys.* **95**, 1-28.

Li, Y.; van der Est, A.; Lucas, M. G.; Ramesh, V. M.; Gu, F.; Petrenko, A.; Lin, S.; Webber, A. N.; Rappaport, F.; Redding, K. (2006) Directing electron transfer within Photosystem I by breaking H-bonds in the cofactor branches. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **103**, 2144-2149.

Li, Y.; Xu, H.; Ouyang, S.; Ye, J. (2016) Metal-organic frameworks for photocatalysis. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **18**, 7563-7572.

Liang, Z.; Qu, C.; Guo, W.; Zou, R.; Xu, Q. (2018) Pristine Metal-Organic Frameworks and their Composites for Energy Storage and Conversion. *Adv. Mater.*, **30**, 1702891.

Lin, R.-B.; Zhang, Z.; Chen, B. (2021) Achieving High Performance Metal-Organic Framework Materials through Pore Engineering. *Acc. Chem. Res.*, **54**, 3362-3376.

Long S.P., Marshall-Colon A. & Zhu X.G. (2015) Meeting the global food demand of the future by engineering crop photosynthesis and yield potential. *Cell* **161**, 56-66.

Lubitz, W., Chrysin, M., Cox, N., (2019). Water oxidation in photosystem II. *Photosynth. Res.* **142**, 105-125.

Mertz E.L., Krishtalik L.I. (2000) Low dielectric response in enzyme active site. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 2081–2086.

Molotokaite, E.; Remelli, W.; Casazza, A.P.; Zucchelli, G.; Polli, D.; Cerullo, G.; Santabarbara, S. (2017) Trapping dynamics in Photosystem I-Light Harvesting Complex I of higher plants is governed by the competition between excited state diffusion from low energy states and photochemical charge separation. *J. Phys. Chem. B*, **121**, 9816–9830.

Moser C.C., Keske J.M., Warncke K., Farid R.S., Dutton P.L. (1992) Nature of biological electron transfer. *Nature* **355**, 796–802.

Muller, P.; Li, X.; Niyogi K. K. (2001) Non-Photochemical Quenching. A Response to Excess Light Energy, *Plant Physiology*, **125**, 1558–1566.

Ort D.R., Merchant S.S., Alric J., Barkan A., Blankenship R.E., Bock R., ... Zhu X.G. (2015) Redesigning photosynthesis to sustainably meet global food and bioenergy demand. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **112**, 8529–8536.

Perego, J.; Villa, I.; Pedrini, A.; Padovani, E.C.; Crapanzano, R.; Vedda, A.; Dujardin, C.; Bezuidenhout, C. X.; Bracco, S.; Sozzani, P.E.; Comotti, A.; Gironi, L.; Beretta, M.; Salomoni, M.; Kratochwil, N.; Gundacker, S.; Auffray, E.; Meinardi, F.; Monguzzi, A. (2021) Composite fast scintillators based on high-Z fluorescent metal–organic framework nanocrystals. *Nat. Photonics*, **15**, 393–400.

Perego, P.; Bracco, S.; Negroni, M.; Bezuidenhout, C. X.; Prando, G.; Carretta, P.; Comotti, A.; Sozzani, P. (2020) Fast motion of molecular rotors in metal–organic framework struts at very low temperatures. *Nat. Chemistry*, **12**, 845–851.

Ptushenko V.V., Cherepanov D.A., Krishtalik L.I., Semenov A.Y. (2008) Semi-continuum electrostatic calculations of redox potentials in photosystem I. *Photosynth. Res.* **97**, 55-74.

Remelli, W.; Santabarbara S. (2018) Excitation and emission wavelength dependence of fluorescence spectra in whole cells of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PPC6803: Influence on the estimation of Photosystem II maximal quantum efficiency. *Biochim. Biophys. Acta – Bioenergetics* **1859**, 1207–1222.

Ryu, U.J.; Kim, S.J.; Lim, H.-K.; Kim, H.; Choi, K.M.; Kang, J.K. (2017) Synergistic interaction of Re complex and amine functionalized multiple ligands in metal-organic frameworks for conversion of carbon dioxide. *Sci Rep*, **7**, 612.

Saito, K.; Shen, J.R.; Ishikita, H. (2012a) Influence of the axial ligand on the cationic properties of the chlorophyll pair in photosystem II from *Thermosynechococcus vulcanus*. *Biophys. J.*, **102**, 2634-2640.

Saito, K.; Umena, Y.; Kawakami, K.; Shen, J.R.; Kamiya, N.; Ishikita, H. (2012b) Deformation of chlorin rings in the Photosystem II crystal structure. *Biochemistry*, **51**, 4290-4299.

Santabarbara, S.; Heathcote, P.; Evans, M.C. (2005) Modelling of the electron transfer reactions in Photosystem I by electron tunnelling theory: the phylloquinones bound to the PsaA and the PsaB reaction centre subunits of PS I are almost isoenergetic to the iron-sulfur cluster F(X). *Biochim. Biophys. Acta*, **1708**, 283-310.

Santabarbara, S.; Kuprov, I.; Fairclough, W. V.; Purton, S.; Hore, P. J.; Heathcote, P.; Evans, M. C.W. (2005) Bidirectional electron transfer in photosystem I: determination of two distances between P700+ and A1- in spin-correlated radical pairs. *Biochem.*, **44**, 2119-2128.

Santabarbara, S.; Remelli, W.; Petrova, A. A.; Casazza, A. P. (2020) Influence of the wavelength of excitation and fluorescence emission detection on the estimation of fluorescence-based physiological parameters in different classes of photosynthetic organisms; in *Fluorescent Methods for Investigation of Living Cells and Microorganisms*, (Grigoryeva N. Ed.), pp. 55–82, InTech Open, London, United Kingdom. ISBN 978-1-83968-040-3.

Santabarbara, S.; Tibiletti, T.; Remelli, W.; Caffari, S. (2017) Kinetics and heterogeneity of energy transfer from light harvesting complex II to photosystem I in the supercomplex isolated from *Arabidopsis*. *Phys Chem Chem Phys.*, **19**, 9210-9222.

Santabarbara, S.; Villafiorita Monteleone, F.; Remelli, W.; Rizzo, F.; Menin, B.; Casazza, A.P. (2019) Comparative excitation-emission dependence of the FV/FM ratio in model green algae and cyanobacterial strains. *Physiol. Plant.* **166**, 351–364.

Siemiarczuk, A.; Wagner, B.A.; Ware, W.R. (1990) Comparison of the maximum entropy and exponential series methods for the recovery of distributions of lifetimes from fluorescence lifetime data. *J. Phys. Chem.* **94**, 1661-1666.

Sipka, G.; Magyar, M.; Mezzetti, A.; Akhtar, P.; Zhu, Q.; Xiao, Y.; Han, G.; Santabarbara, S.; Shen, J.-R.; Lambrev, P.H.; Garab, G. (2021) Light-adapted charge-separated state of photosystem II: structural and functional dynamics of the closed reaction center, *Plant Cell*, **33**, 1286–1302.

Slattery R.A. & Ort D.R. (2015) Photosynthetic energy conversion efficiency: Setting a baseline for gauging future improvements in important food and biofuel crops. *Plant Physiol.* **168**, 383–392.

Slattery R.A. & Ort D.R. (2021) Perspectives on improving light distribution and light use efficiency in crop canopies. *Plant Physiol.* **185**, 34–48.

Straume, M.; Frasier-Cadoret, S.; Johnson, M.L., in *Topics of Fluorescence Spectroscopy 2*, ed. J. R. Lakowicz, Plenum Press, New York, USA, 1991, vol. 2, pp. 177–240.

Tachibana, Y.; Vayssieres, L.; Durrant, J. R. (2012) Artificial photosynthesis for solar water-splitting. *Nat. Photonics*, **6**, 511-518.

Tardy F., & Havaux M. (1996). Photosynthesis, chlorophyll fluorescence, light-harvesting system and photoinhibition resistance of a zeaxanthin-accumulating mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Photochemistry and Photobiology*; **34**, 87-94.

Torres, R.A.; Lovell, T.; Noodleman L.; Case D.A. (2003) Density functional and reduction potential calculations of Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub> clusters. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 1923-1936.

Ullman, A.M.; Brown, J.W.; Foster, M.E.; Léonard, F.; Leong, K.; Stavila, V.; Allendorf, M.D. (2016) Transforming MOFs for energy applications using the Guest@MOF concept. *Inorg. Chem.*, **55**, 7233-7249.

Umena, Y.; Kawakami, K.; Shen, J.R.; Kamiya, N. (2011) Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at a resolution of 1.9 Å. *Nature*, **473**, 55-60.

Wasson, M.C.; Buru, C.T.; Chen, Z.; Islamoglu, T.; Farha, O.K. (2019) Metal–organic frameworks: A tunable platform to access single-site heterogeneous catalysts. *Appl. Catal. A Gen.*, **586**, 117214.

Whelan, É.; Steuber, F. W.; Gunnlaugsson, T.; Schmitt, W. (2021) Tuning photoactive metal–organic frameworks for luminescence and photocatalytic applications. *Coordinat. Chem. Rev.*, **437**, 213757.