

FIKOBILIPROTEIDY I ICH NATURALNE KOMPLEKSY - FIKOBILISOMY

(Struktura i migracja energii wzbudzenia elektronowego)

Józef Grabowski

Instytut Inżynierii Środowiska Politechniki
Poznańskiej, 60-965 Poznań ul. Piotrowo 5

Pierwotne procesy fotosyntezy - absorpcja światła przez barwniki pomocnicze i chlorofil a, migracja energii wzbudzenia elektronowego w układzie barwników aparatu fotosyntetycznego i wzbudzenie drobin chlorofilu z centrum reakcji biochemicznej oraz ostateczny los tej energii; w wielu konkretnych przypadkach mogą decydować o wydajności energetycznej (a stąd i produktywności) fotosyntezy. Pierwotna faza fotosyntezy jest wciąż mało poznana - składa się na to wiele przyczyn, między innymi, bardzo krótki czas trwania badanych procesów: rzędu 10^{-12} - 10^{-8} sek (a stąd i trudnościami eksperymentalnymi) oraz złożoną i niewystarczająco poznana struktura aparatu fotosyntetycznego.

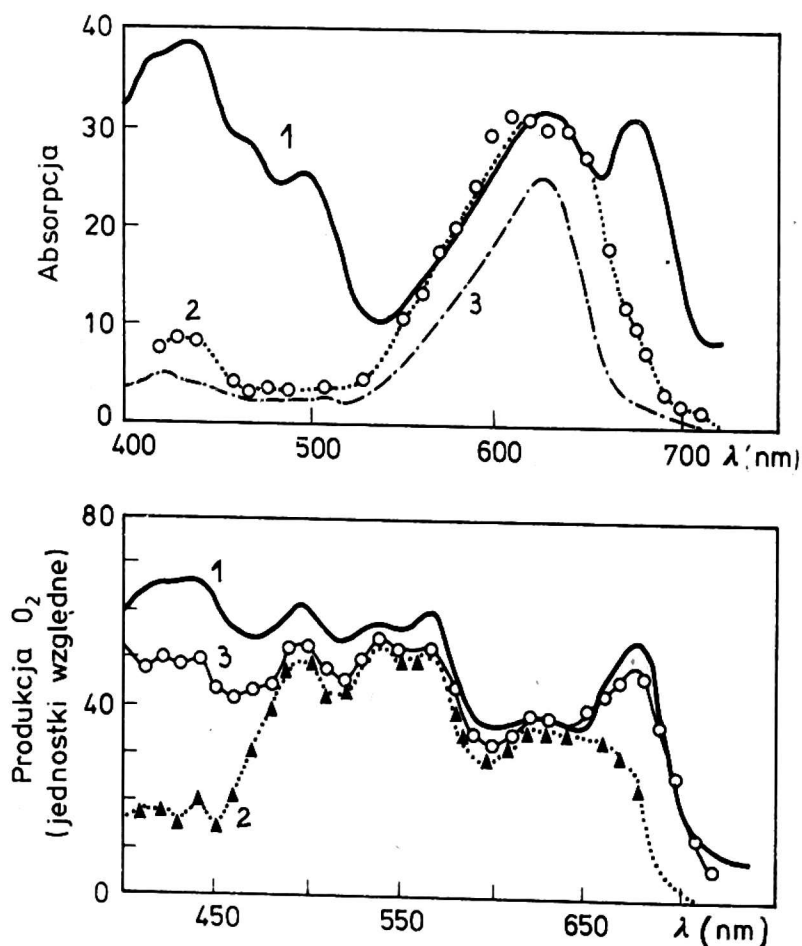
W celu uzyskania danych o migracji energii wzbudzenia elektronowego między fikobilinami (grupy chromoforowe fikobiliproteidów) w fikobilisomach badano własności spektralne, jak widma absorpcji i fluorescencji, widma polaryzacji wzbudzenia fluorescencji oraz czasy życia i absolutne wydajności kwantowe fluorescencji; zarówno dla fikobilisomów, ich składowych fikobiliproteidów oraz kompleksów fikobiliproteidowych wyizolowanych z fikobiliproteidów oraz kompleksów fikobiliproteidowych wyizolowanych z fikobilisomów.

Badane fikobilisomy wyizolowano, stosując procedurę opracowaną przez Gantt i wsp. [1-3], z glonów: *Porphyridium cruentum*, *Nostoc* sp. oraz *Fremyella diplosiphon* - kompleksy fikobiliproteidowe uzyskano z fikobilisomów wyizolowanych z *Porphyridium sordidum*. W celu uzyskania informacji o sile i rodzaju wiązań pomiędzy fikobiliproteidami w fikobilisomach zbadano wpływ niektórych czynników, jak: duża lepkość, siła jonowa, niska temperatura (77 K) oraz

wysokie ciśnienie hydrostatyczne (do 2000 atm) na widma fluorescencji i absorpcji kompleksów fikobiliproteidowych oraz fikobilisomów *in vitro*.

FIKOBILIPROTEIDY I ICH ROLA W FOTOSYNTYZIE

Fikobiliproteidy (fikoerytryna, fikocyjanina i allofikocyjanina) są globularnymi chromoproteidami - mogą one stanowić 24% i więcej [4] ogólnej masy białka w glonach z grupy sinic (Cyanophyta), krasnorostów (Rhodophyta) oraz kryptomonadowców (Cryptophyta). Zainteresowanie fikobiliproteidami datuje się od ukazania znanej pracy Engelmana [5], w której wykazano, że światło absorbowane przez te barwniki jest, u wymienionych mikroorganizmów, wykorzystywane na potrzeby fotosyntezy (rys. 1 - góra). Dalsze badania widm działania fotosyntezy wykazały dodatkowy fakt, a mianowicie że światło zaabsorbowane przez fikobiliproteidy jest wykorzystywane efektywniej niż to, które zostało zaabsorbowane bezpośrednio przez chlorofil (rys. 1 - dół).



Rys. 1. Góra: widmo absorpcji (1) - (jed. wzgl.) glonów *Porphyridium aeruginum*; widmo działania fotosyntezy (2) oraz widmo absorpcji fikocyjaniny (3). Dół: widmo absorpcji (1) glonów *Drouetia rotata*; widma działania fotosyntezy bez (2) i z (3) dodatkowym oświetleniem długością fali 546 nm

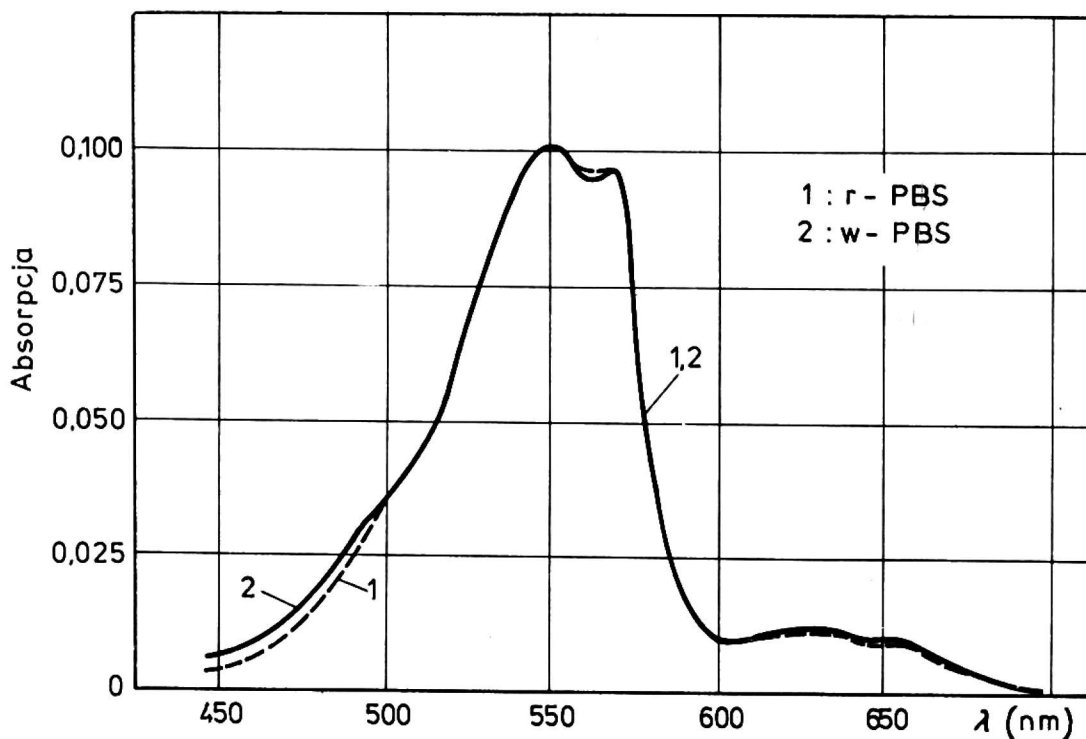
Ten stojący w sprzeczności z wynikami prac Duysensa [6] fakt, stał się zrozumiały dopiero po ukazaniu się pracy Forka [7] - pokazała ona, że aktywność fotosyntetyczna, dla światła z zakresu absorpcji chlorofilu, znacznie wzrasta, gdy zastosować dodatkowo światło absorbowane przez fikobiliproteidy (rys. 1 - dół). Obserwowane zjawisko, będące odpowiednikiem już wcześniej wykrytego przez Emersona i Lewisa [8] tzw. efektu wzmożenia, stanowiło poparcie dla koncepcji dwu fotoukładów w aparacie fotosyntetycznym. Wykazało ono ponadto, że fikobiliproteidy są w pewien sposób (strukturalny lub energetyczny) związane z fotoukładem II, gdyż ich energia wzbudzenia wędruje selektywnie do chlorofilu z tego układu tzw. chlorofilu krótkofalowego [9].

In vivo energia wzbudzenia fikobiliproteidów jest przekazywana z wydajnością 90-100% do chlorofilu [6] i przez to wykorzystywana w fotosyntezie. Ta wysoka wydajność przekazywania sugeruje, że barwniki te są zorganizowane. Dziś, mimo jeszcze nie tak licznej grupy prac [1-3, 10-13] wydaje się, że w sinicach i krasnorostach, w przeciwieństwie do kryptomonadowców [14] fikobiliproteidy są wysoce zagregowane i tworzą charakterystyczne granule (zwane obecnie fikobilisomami) po zewnętrznych stronach lamel fotosyntetycznych (rys. 9).

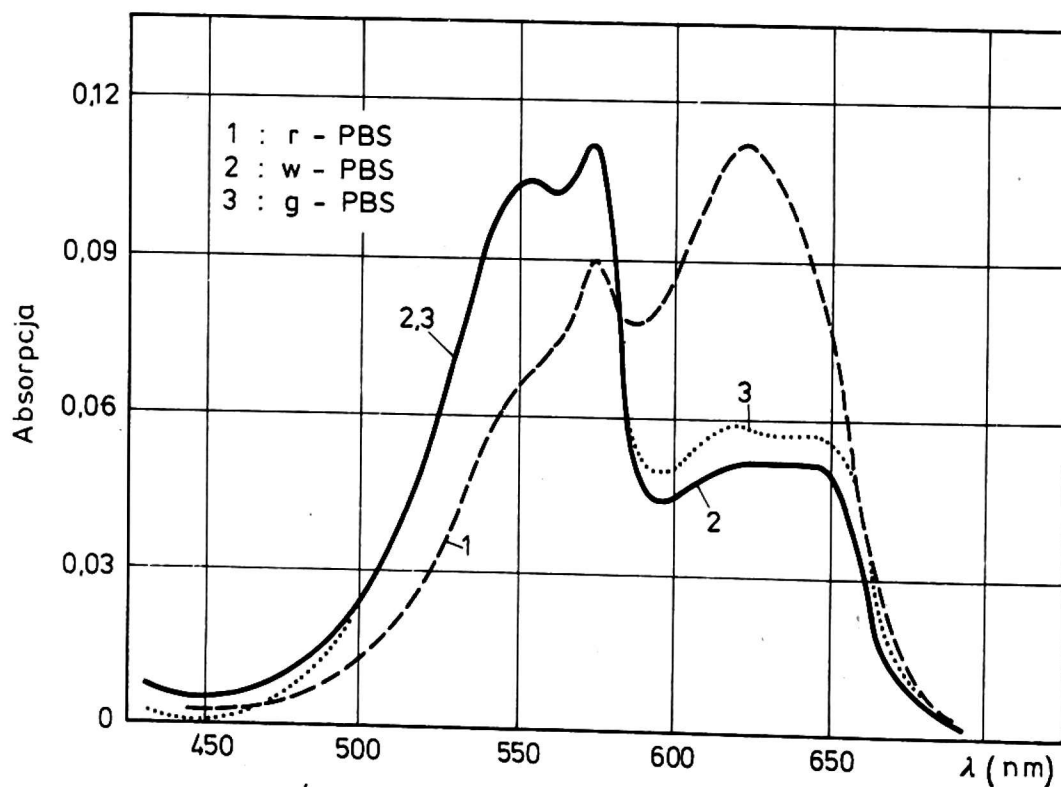
Nowe światło na rolę i stan fikobiliproteidów in vivo rzucają ostatnie wyniki Ohki i Katoh [15-17]. Autorzy ci pokazali, że w organotroficznie hodowanych komórkach glonów *Anabaena variabilis* fikobilisomy są równie dobrze syntetyzowane w warunkach światła jak i ciemności oraz że jedynie fikobilisomy wytworzone w warunkach ciemności przekazują energię do chlorofilu długofalowego, tj. z fotoukładu I.

SKŁAD FIKOBILIPROTEIDOWY FIKOBILISOMÓW

Głony z grupy sinic i krasnorostów charakteryzuje zwykle, duża zdolność adaptacji chromatycznej - często np. można zaobserwować zmianę barwy komórek wywołaną sezonową zmianą składu spektralnego światła słonecznego. W pracy stwierdzono, że w przypadku *Porphyridium cruentum* warunki świetlne stosowane w hodowli nie mają żadnego wpływu na skład fikobiliproteidowy wyizolowanych fikobilisomów (rys. 2). W przeciwieństwie do glonów, kultury *Nostoc* sp. (rys. 3) oraz *Fremyella diplosiphon* [18] wykazują dużą adaptację



Rys. 2. Widma absorpcji fikobilisomów wyizolowanych z *Porphyridium cruentum* hodowanych w świetle białym (2) i czerwonym (1)



Rys. 3. Widma absorpcji fikobilisomów wyizolowanych z *Nostoc* sp. hodowanych w świetle czerwonym (1), białym (2) i zielonym (3)

chromatyczną. Fikobilisomy wyizolowane z kultur hodowanych w warunkach światła białego (i zielonego) zawierają dużo fikoerytryny (absorpcja 520-570 nm) oraz względnie mniej fikocyjaniny (absorp-

cja 610-630 nm) i allofikocyjaniny (absorpcja 640-660 nm). Rodzaj fikobiliproteidów zawartych w fikobilisomach zależy przede wszystkim od glonów, które stanowiły ich źródło (tab. 1).

T a b e l a 1

Skład fikobiliproteidowy fikobilisomów

Głony	Fikobiliproteid		
	fikoerytryna	fikocyjanina	allofikocyjanina
<i>Porphyridium cruentum</i>	b-PE, B-PE	R-PC	APC
<i>Nostoc sp.</i>	CPE-I, CPE-II	CPC	APC
<i>Fremyella diplosiphon</i>	CPE	CPC	APC
<i>Anacystis nidulans</i>	-	CPC	APC

WYDAJNOŚĆ I MECHANIZM MIGRACJI ENERGII WZBUDZENIA
W FIKOBILISOMACH

W natywnych fikobilisomach energia wzbudzenia elektronowego fikoerytryny i fikocyjaniny jest przekazywana z dużą wydajnością do allofikocyjaniny. Świadczy o tym wiele faktów doświadczalnych:

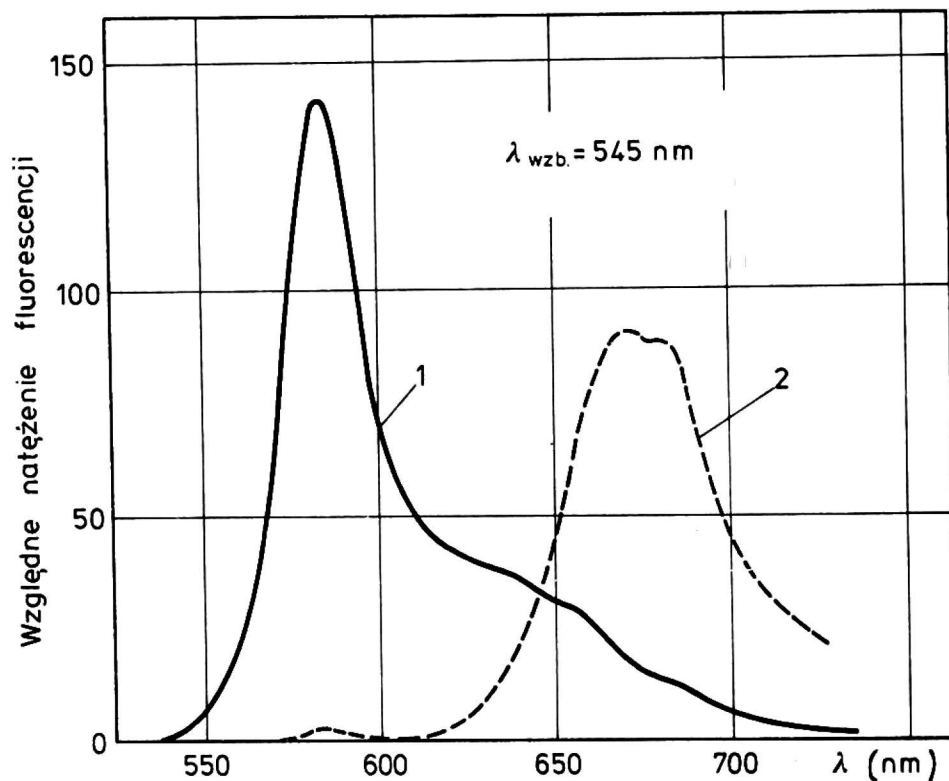
1) silna fluorescencja w obszarze widmowym typowym dla allofikocyjaniny (mimo wzbudzenia w zakresie, gdzie absorbuje głównie fikoerytryna - rys. 4);

2) fluorescencja fikobilisomów jest praktycznie zdepolaryzowana dla wzbudzeń, gdzie przeważa absorpcja fikoerytryny i fikocyjaniny - porównaj rys. 5 z rys. 6 i 7;

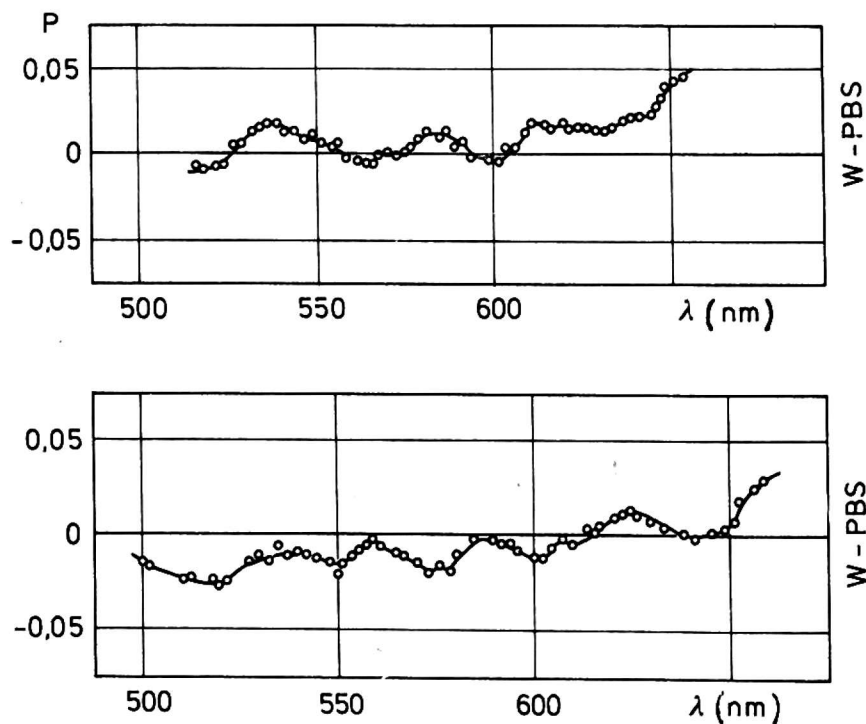
3) absolutna wydajność fluorescencji fikobilisomów jest porównywalna z wydajnością allofikocyjaniny - patrz tabele 2 i 3.

Oszacowane z krzywych fluorescencji dla fikobilisomów natywnych i zdysocjowanych wydajności przekazywania energii (tab. 3), 94-98% są zgodne z wartościami uzyskanymi dla fikobilisomów *in vivo* [20].

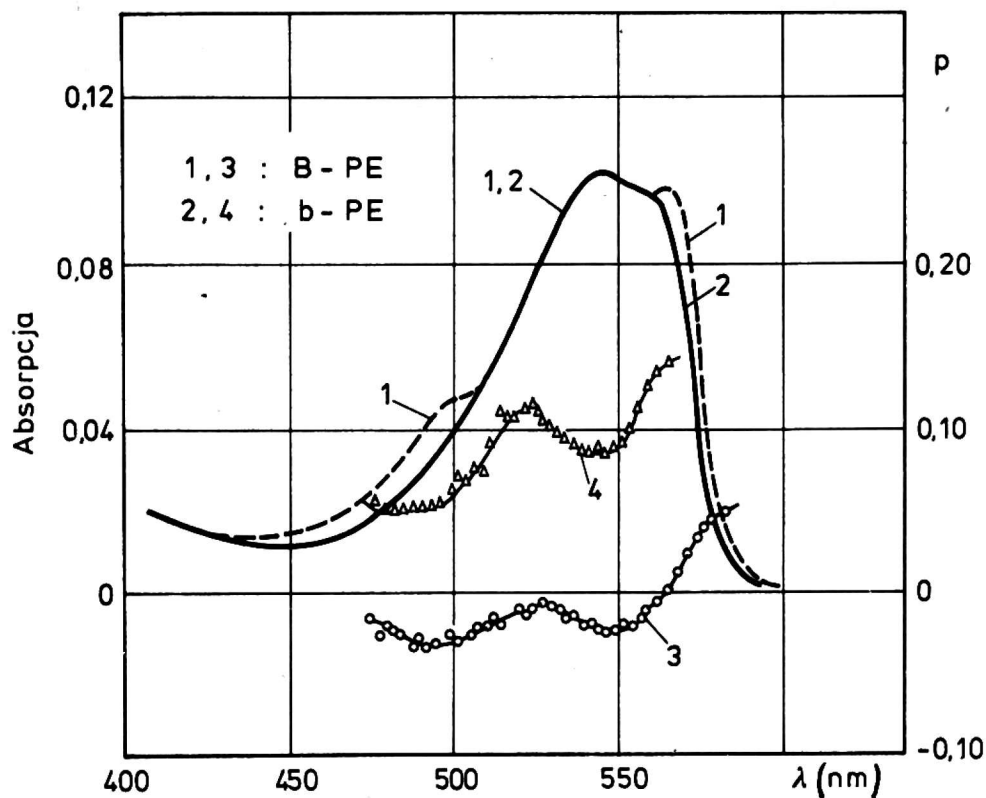
Dla wyznaczenia najbardziej prawdopodobnej drogi migracji energii w fikobilisomach konieczne było ustalenie najpierw mechanizmu tej migracji, tj. wykładnika potęgi w zależności stałej przekazania (k_T) od odległości pomiędzy oddziaływującymi drobina-



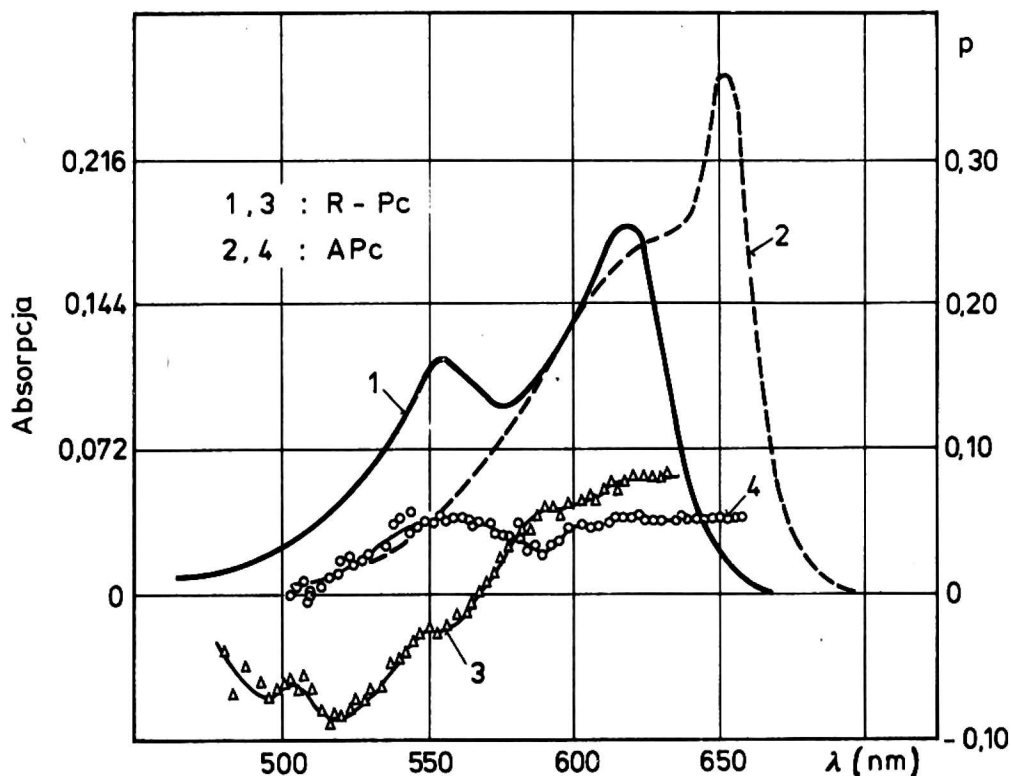
Rys. 4. Widma fluorescencji fikobilisomów wyizolowanych z *Nostoc* sp. fikobilisomy natywne (2) - bufor fosforanowy 0,75 M, pH 6,8; oraz zdysocjowane (1) - bufor fosforanowy 0,05 M



Rys. 5. Widma polaryzacji fluorescencji fikobilisomów z *Fremyella diplosiphon* (góra) i z *Nostoc* sp. (dół) dla emisji przy 680 nm



Rys. 6. Widma absorpcji (1 i 2) i polaryzacji fluorescencji (3 i 4) fikoerytryn wyizolowanych z fikobilisomów *Porphyridium cruentum*



Rys. 7. Widma absorpcji (1 i 2) oraz polaryzacji fluorescencji (3 i 4) fikobiliproteidów wyizolowanych z fikobilisomów *Porphyridium cruentum*

T a b e l a 2

Współczynniki ekstynkcji (ϵ_m - wartość maksymalna), czasy życia (τ) i absolutne wydajności kwantowe Φ fluorescencji fikobiliproteidów [19]

Fikobiliproteid	$\epsilon_m \times 10^{-4} (\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1})$	Φ	$\tau (\text{ns})$
b-PE	8,2	0,48 \pm 0,03	2,9 \pm 0,4
B-PE	15,2	0,98 \pm 0,05	3,2 \pm 0,3
CPE	-	0,88 \pm 0,05	-
CPE-I	11,0	0,67 \pm 0,04	2,6 \pm 0,2
CPE-II	6,9	0,45 \pm 0,03	2,8 \pm 0,1
R-PC	13,9	0,59 \pm 0,03	2,0 \pm 0,1
CPC	8,3	0,52 \pm 0,03	2,2 \pm 0,2
APC	13,1	0,68 \pm 0,04	2,7 \pm 0,1

T a b e l a 3

Absolutne wydajności kwantowe fluorescencji fikobilisomów oraz wydajności przekazywania energii PE \rightarrow PC w fikobilisomach in vitro

Wydajność	Źródło fikobilisomów		
	Porphyridium cruentum	Nostoc sp.	Fremyella diplosiphon
Kwantowa fluorescencji	0,60	0,65	0,68
Przekazywania energii	0,94	0,98	0,97

mi (R). W konkretnej sytuacji zasadniczy wpływ na mechanizm ma energia oddziaływania układu - ta z kolei, oprócz natury drobin, jest zdeterminowana odległością między donorem i akceptorem energii wzbudzenia. Oszacowana energia oddziaływania między fikobilidami w układach fikobiliproteidowych, przy założeniu, że zasadni-

czy przyczynek do oddziaływania wnosi oddziaływanie „dipol - dipol elektryczny”; jest rzędu $9,2 \text{ cm}^{-1}$. Jest to energia mała - typowa dla przypadku tzw. bardzo słabego oddziaływania, w którym to jest spełniona zależność: $k_T \sim R^{-6}$. Dokładną wartość potęgi w zależności $k_T \sim R^m$, wyznaczono z związku Kenkre i Knoxa [21]:

$$m = 6 \left[\frac{q k_T}{\alpha} - \frac{1}{1 - \exp - \frac{\alpha}{q k_T}} \right]$$

gdzie q jest liczbą koordynacyjną układu wielodrobinowego, a α stałą spektroskopową. Po wstawieniu odpowiednich wielkości charakteryzujących fikobiliny, otrzymuje się z tego związku $m = -5,99$. W pracy stanowiło to podstawę do przyjęcia tezy o bardzo słabym oddziaływaniu, tj. że przekazywanie energii w układzie fikobilin odbywa się zgodnie z mechanizmem długozasięgowego rezonansowego (bezpromienistego) przekazania, opracowanego szczegółowo przez Förstera [22].

Znajomość mechanizmu migracji pozwala oszacować prawdopodobieństwa przekazania energii między fikobiliproteidami wchodzącymi w skład fikobilisomów. W teorii Förstera [22] miarą prawdopodobieństwa na przekazywanie energii wzbudzenia jest tzw. odległość krytyczna R_0 - jest to odległość donor - akceptor, dla której prawdopodobieństwo przekazywania jest równe prawdopodobieństwu przejścia ze stanu wzbudzonego do podstawowego (donora) innymi drogami (fluorescencja, konwersja wewnętrzna, itd.). Oczywiście im większa wartość R_0 tym większe jest prawdopodobieństwo przekazania energii drogą rezonansu.

Analizując wartości R_0 uzyskane dla wszystkich możliwych przekazania między składowymi fikobiliproteidami fikobilisomów, wywnioskowano, że dla wytłumaczenia tak wysokiej (obserwowanej w doświadczeniu) wydajności przekazania energii od fikoerytryny i fikocyjaniny do allofikocyjaniny, konieczne staje się założenie, że fikobiliproteidy są „rozłożone” w fikobilisomach heterogennie - i najprawdopodobniej w kolejności, jak ukazuje to schemat 1.

To, że niedawno udało się wyizolować mieszane kompleksy fikobiliproteidowe, jak: B-PE - CPC z fikobilisomów *Porphyridium sordidum* oraz b-PE - B-PE - CPC z fikobilisomów *Rhodospirillum rubrum* stanowi pewne potwierdzenie proponowanej w schemacie 1, drogi mi-

gracji energii wzbudzenia a tym samym i rozkładu fikobiliproteinów w fikobilisomach z *Porphyridium cruentum*.

Schemat 1

Prawdopodobna droga migracji energii wzbudzenia elektronowego w układzie fikobilin:

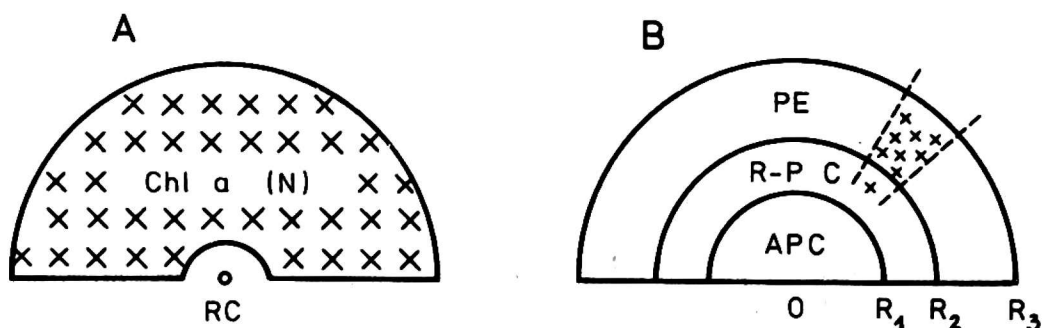
- w fikobilisomach z *Porphyridium cruentum*

44-55	49-62	47-59	56-71	49-61	57-72	54-68
b-PEB	b-PEB	B-PEB	B-PEB	R-PCB	R-PCB	APCB
	41-52		15-19		39-49	APCB

- w fikobilisomach z *Nostoc sp.*

42-53	46-58	44-55	53-67	46-58	58-73
C-PEIIB	C-PEIIB	C-PEIB	C-PEIB	C-PCB	C-PCB
	40-51		15-19		39-49

Wartości liczbowe stanowią odległości krytyczne R_0 na przekazanie energii. Dolne wartości obrazują prawdopodobieństwo na przekazanie przeciwne do spadku energii (tzw. uphill transfer). Średni czas przekazania energii wzbudzenia od PE do PC w fikobilisomach, obliczony z teorii Pearlsteina a (250 ± 30 ps) i Paillotina b (330 ± 40 ps) wyznaczono bazując na modelu Gantt [2] fikobilisomu (rys. 8 i 9).



Rys. 8. Model jednostki fotosyntetycznej (A) w teorii Pearlsteina oraz model Gantt fikobilisomu (B) z *Porphyridium cruentum*; PE : : 84%, R-PC : 11%, APC : 5%; $R_1 = 9,5$ nm, $R_2 = 14$ nm, $R_3 = 25,7$ nm

¹Po uwzględnieniu warunków doświadczalnych [18] wzór ogólny uległ znacznemu uproszczeniu i powinien spełniać założenia teorii Pearlsteina.

²Dane eksperymentalne 280 ± 40 ps.

T a b e l a 4

Warunki dysocjacji fikobilisomów i kompleksu B-PE - CPC

Czynniki	Układy badane		
	kompleks B-PE - CPC	fikobilisomy	
		z Nostoc sp.	z Porph. cr. ^a
Stężenie buforu (M)	$\geq 0,005$	$\leq 0,75$	$\leq 0,50$
Ciśnienie (atm)	≥ 880	≤ 1750	≥ 3500

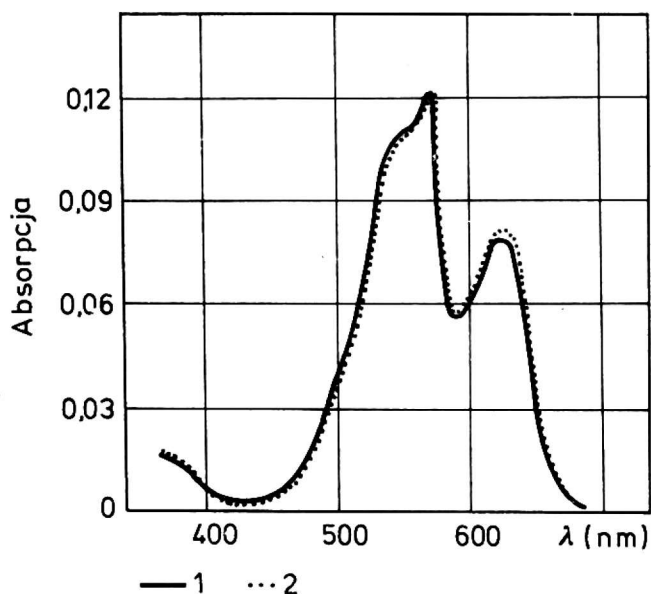
^a Wyniki nieopublikowane, otrzymane od dr Wanga i dr Govindjee.

Dane przedstawione w tabeli 4, wskazują na słuszność poprzednich wniosków: mechanizm migracji energii, układ fikobiliproteidów w fikobilisomach. Ponadto potwierdzają tezę o pełnej funkcjonalności fikobilisomów in vitro (wydajnie przekazywanie energii do jądra APC fikobilisomu) - wyznaczone czasy są zgodne z czasami przekazania PE-PC-APC-Chl (250-500 ps) uzyskanymi drogą bezpośredniego pomiaru dla fikobilisomów in vivo [20].

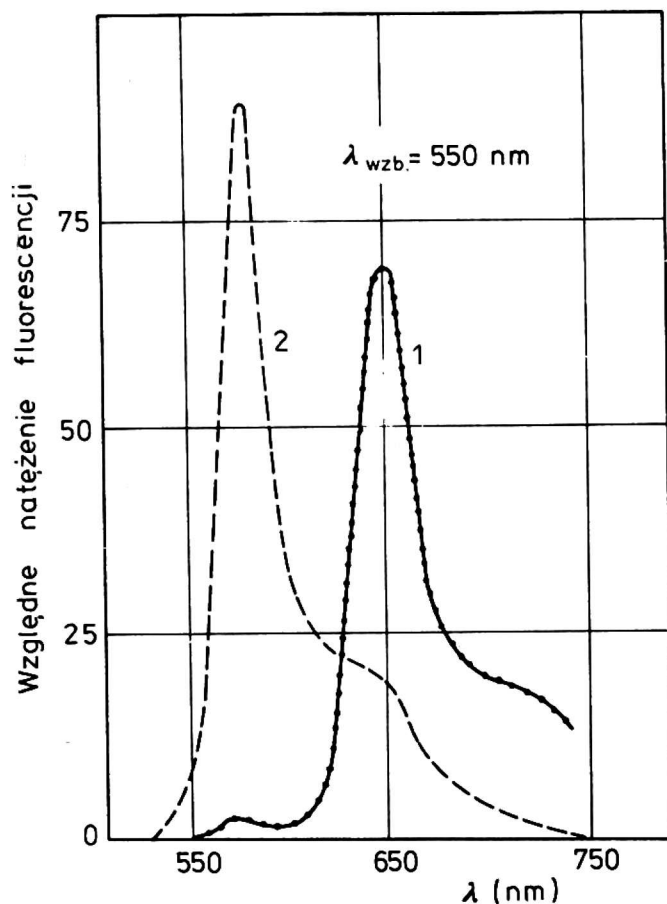
KOMPLEKSY FIKOBILIPROTEIDOWE

Niedawne doniesienia Mörschela i wsp. [13] wskazują na to że w fikobilisomach można wyróżnić (co widać na elektronogramach) pewne jednostki - kompleksy fikoerytrynowo-fikocyjaninowe. Do chwili obecnej udało się wyizolować niektóre z nich, np. B-PE - CPC z *Porphyridium sordidum* (widma absorpcji i fluorescencji kompleksu są przedstawione na rys. 10 i 11), b-PE - B-PE - CPC z *Rhodorus marinus* oraz PE - PC z *Nostoc sp.*

W pracy badano własności spektralne kompleksu B-PE - CPC dla różnych warunków fizykochemicznych. Niezwykle interesujące jest, że wymieniony kompleks jest - przeciwnie niż można byłoby oczekiwać - stabilny jedynie w wodzie destylowanej. Nawet tak małe stężenie buforu fosforanowego (pH 6,8-7,0), jak 0,01 powoduje dość



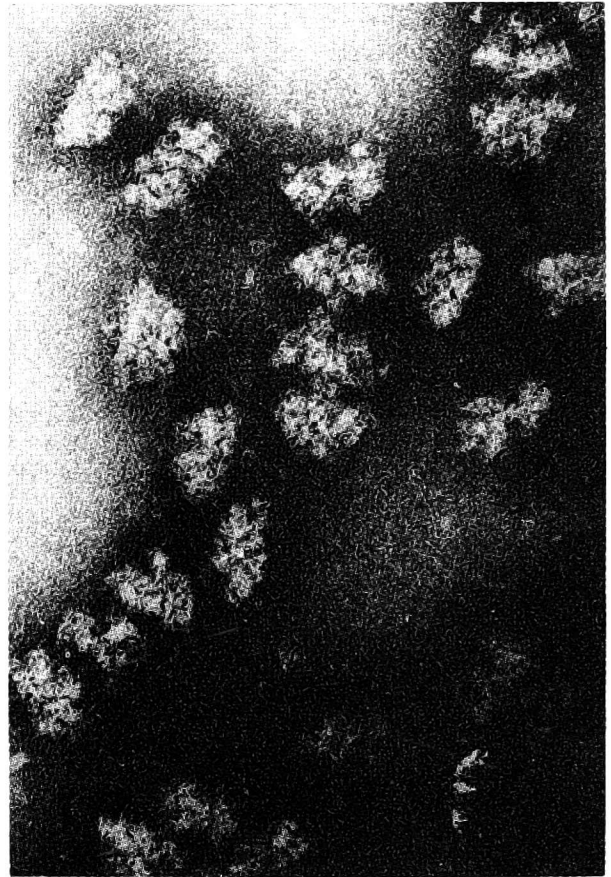
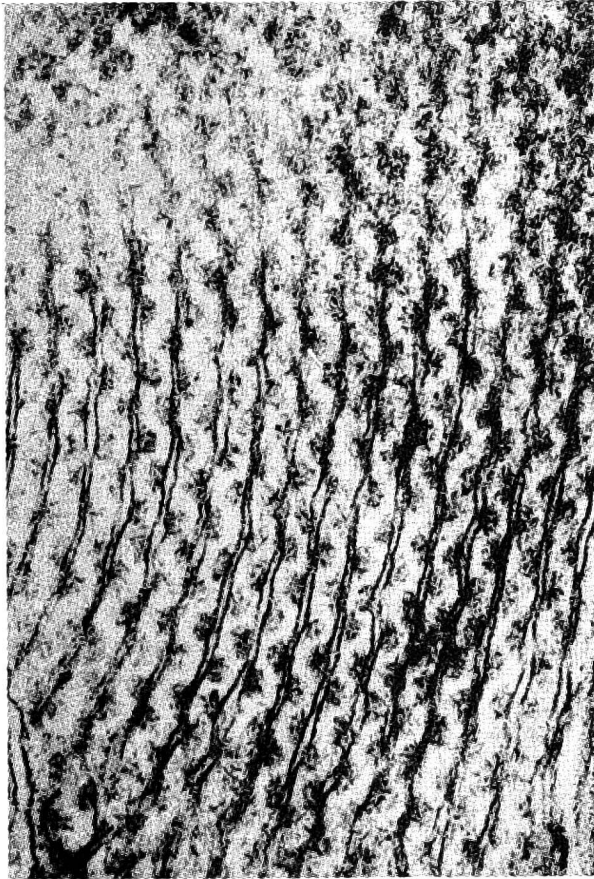
Rys. 10. Widma absorpcji kompleksu B-PE - CPC z *Porphyridium sordidum* bezpośrednio po wyizolowaniu (1) oraz powstałe w wyniku reasocjacji (2) składowych fikobiliproteidów B-PE i CPC



Rys. 11. Widma fluorescencji kompleksu B-PE - CPC z *Porphyridium sordidum* w wodzie destylowanej (1) oraz w buforze fosforanowym (pH 6,8-7,0) o stężeniu 0,05 M (2) - kompleks zdysocjowany na składowe fikobiliproteidy B-PE i CPC

szybką jego dysocjację na składowe fikobiliproteidy. Inną ciekawą obserwacją jest też to, że rozdzielone (w wyniku dysocjacji i ultrawierowania w gradiencie stężenia sacharozy) fikobiliproteidy: B-PE i CPC, po wprowadzeniu do wody destylowanej reasocjują w pierwotny kompleks (rys. 10). W natywnym kompleksie energia wzbudzenia fikoerytryny jest przekazywana do fikocyjaniny (jak oszacowano z widm fluorescencji kompleksu przed i po dysocjacji - rys. 11) z wydajnością rzędu $0,975 \pm 0,005$ - co odpowiada średniemu czasowi przekazania 80 ± 40 ps.

Widma polaryzacji fluorescencji kompleksu uzyskane dla roztworów o dużych lepkościach (7,80 i 72,00 cP) nie różnią się praktycznie od widma otrzymanego dla roztworu wodnego [25]. Świadczy to o tym, że układ chromoforów w matrycy białkowej kompleksu można traktować jako sztywny - przynajmniej dla czasów rzędu czasu



Rys. 9. Fikobilisomy z *Porphyridium cruentum* in vivo (lewa strona, powiększenie 115 000 x) i in vitro (prawa strona, powiększenie 280 000 x) - elektronogramy nadesłane przez E. Gantt (Smithsonian Institution, USA)

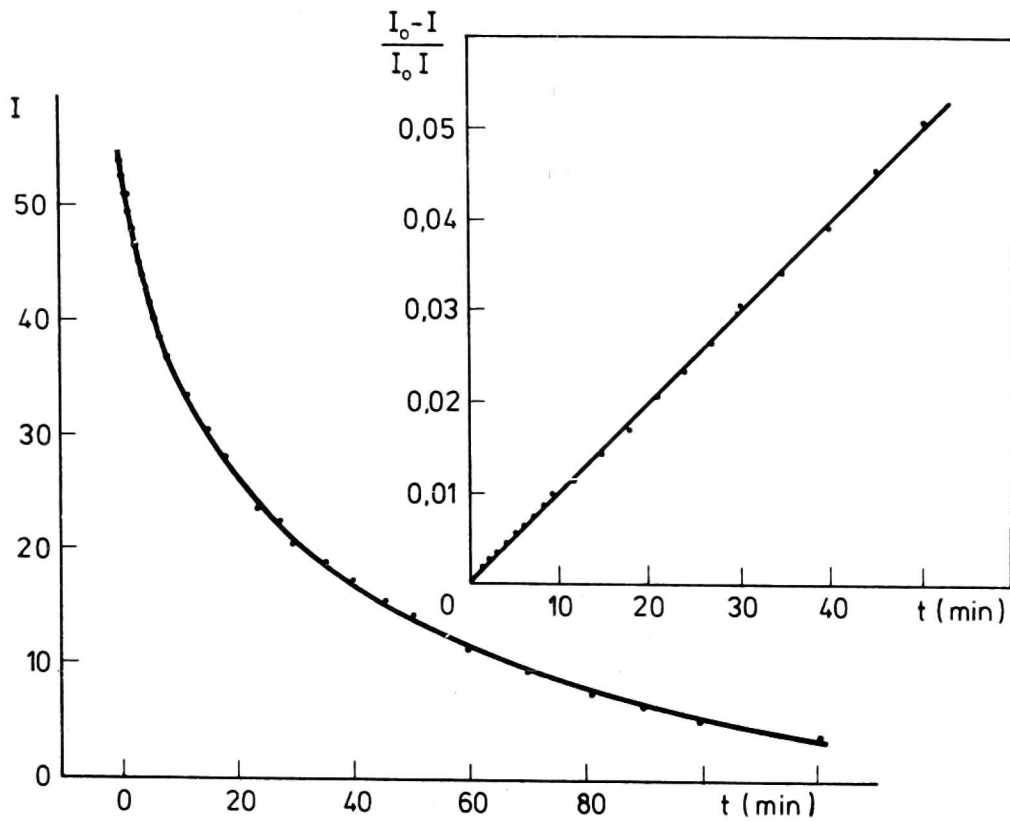
życia fluorescencji. W celu uzyskania informacji o oddziaływaniach pomiędzy B-PE i CPC w kompleksie badano wpływ wysokiego ciśnienia hydrostatycznego na widma absorpcji i fluorescencji kompleksu.

Zachowaniem się układu w warunkach wysokiego ciśnienia hydrostatycznego rządzi reguła Le Chatelier tzw. reguła przekory „wzrost ciśnienia faworyzuje procesy, które prowadzą do zmniejszenia objętości układu oraz inhibuje te procesy, w wyniku których objętość układu musiałaby wzrosnąć”. Z literatury [26, 27] wiadomo np., że rozrywaniu się wiązań hydrofobowych i jonowych towarzyszy malenie, natomiast rozrywaniu się wiązań wodorowych wzrost, objętości. Tak więc, wzrost ciśnienia stymuluje rozrywanie wiązań hydrofobowych i jonowych i ewentualne tworzenie (lub wzmocnienie) wiązań wodorowych. Fakt ten stanowi jedną z zasadniczych przyczyn stosowania technik wysokociśnieniowych do badania charakteru wiązań w makromolekułach.

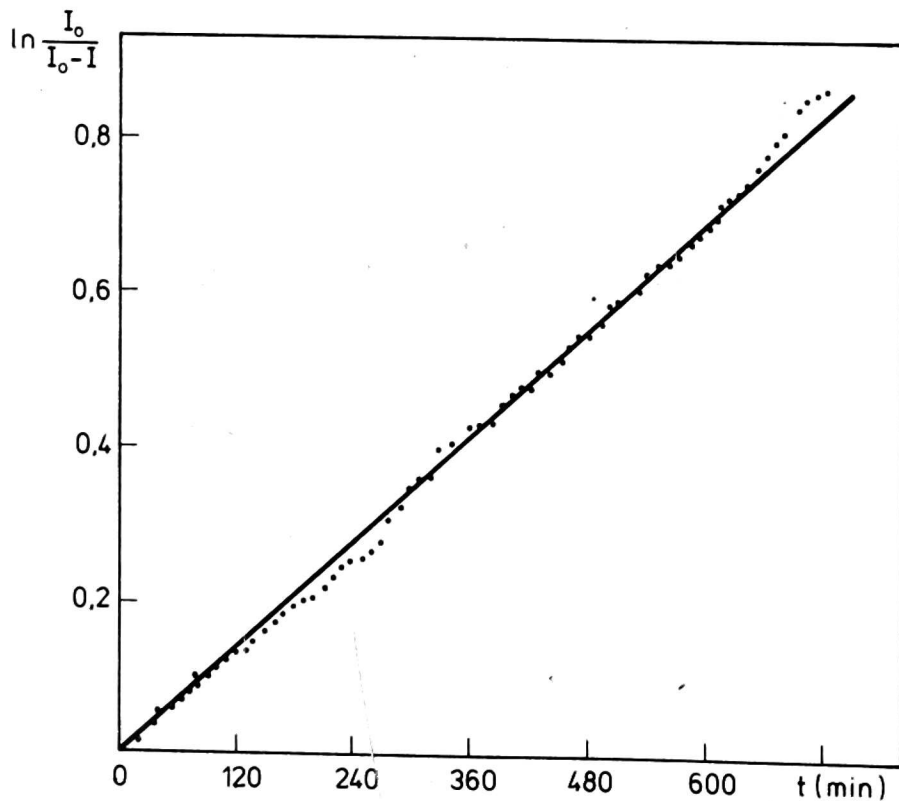
Wysokie ciśnienie powoduje dysocjację kompleksu B-PE - CPC, co objawia się wzrostem natężenia fluorescencji przy 580 nm (emisja B-PE) - kinetyka dysocjacji jest przedstawiona na rysunku 13.

Do zdysocjowania świeżo przygotowanego kompleksu konieczne jest ciśnienie rzędu 880 atm. Kinetyka dysocjacji, w szczególności zachowanie prostoliniowego charakteru zależności $\ln I/(I_0 - I)$ od czasu, wskazuje na to, że jest to proces pierwszego rzędu z stałą rozpadu $2,0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ i czasem połowicznym około 36 000 s. Obie prostoliniowe zależności (z rys. 12 i 13) potwierdzają tezę, że stosunek drobin fikoerytryny do drobin fikocyjaniny w kompleksie B-PE - CPC jest 1:1. Dysocjacja kompleksu indukowana wysokim ciśnieniem jest - jak stwierdzono w licznych eksperymentach - nieodwracalna (przypuszczalnie zachodzą pewne denaturacyjne zmiany w komponentach białkowych).

Wpływ stężenia buforu (siły jonowej) oraz wysokiego ciśnienia na zachowanie się kompleksu (tab. 5) wskazuje na to, że w kompleksie głównymi wiązaniami stabilizującymi strukturę są wiązania jonowe - gdy znaczenie wiązań jonowych jest zredukowane przez wzrastającą siłę jonową roztworu, następuje dysocjacja. Stosunkowo niskie ciśnienie wystarczające do spowodowania dysocjacji świadczy o tym, że zarówno wiązania jonowe, jak i ewentualne hydrofobowe, są dość słabe w kompleksie B-PE - CPC.



Rys. 12. Kinetyka reasocjacji kompleksu B-PE - CPC z składowych fikobiliproteidów: B-PE i CPC; $I = F - f$; $I_0 = F_0 - f$ (gdzie F - natężenie fluorescencji przy 580 nm po czasie t od chwili zmieszania B-PE i CPC; F_0 - natężenie fluorescencji przy 580 nm w chwili $t = 0$; oraz f - natężenie fluorescencji przy 580 nm dla natywnego kompleksu B-PE - CPC, tj. po całkowitym zreasocjowaniu)



Rys. 13. Kinetyka dysocjacji kompleksu B-PE - CPC przy ciśnieniu hydrostatycznym 880 atm; oznaczenia jak do rys. 12

STRUKTURA I ODDZIAŁYWANIE MIĘDZY FIKOBILIPROTEIDAMI
W FIKOBILISOMACH

Badania Gantt i wsp. [1-3] wykazały, że do utrzymania fikobilisomów w stanie funkcjonalnym *in vitro*, konieczne jest stosowanie roztworów o dużym stężeniu buforu rzędu 0,5-0,7 M. Wzrostowi siły jonowej, towarzyszy ekranowanie oddziaływań jonowych przy równocześnie mierzalnym wzroście oddziaływań hydrofobowych. Stąd można wnioskować, że wiązania hydrofobowe odgrywają istotną rolę w utrzymaniu struktury fikobilisomów.

T a b e l a 5

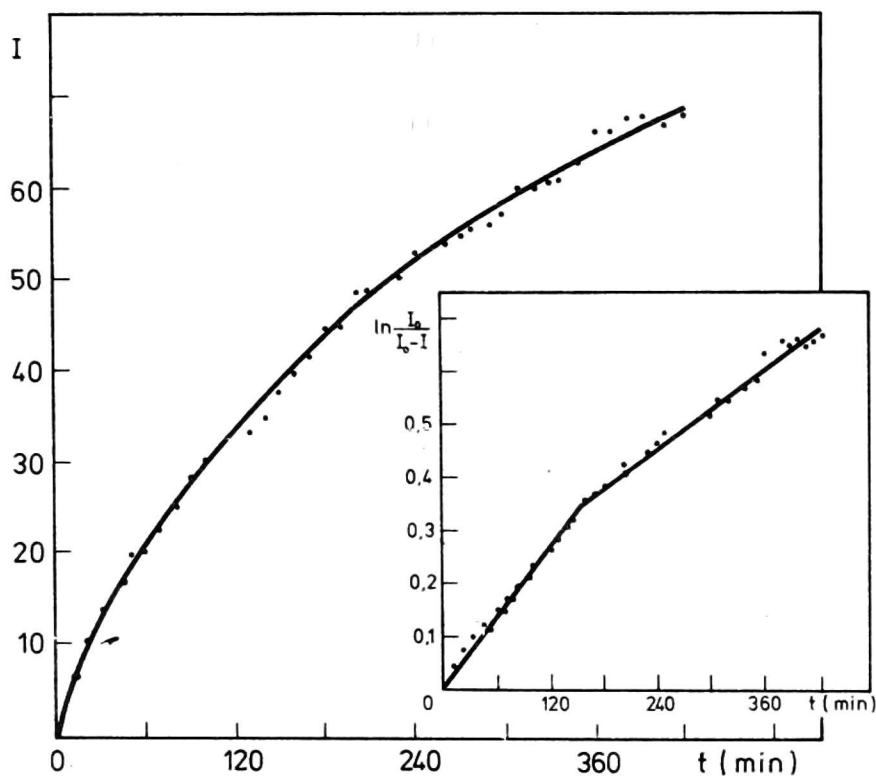
Zmiana objętości właściwej makromolekuł związana z ich dysocjacją

Wyszczególnienie	Masa cząsteczkowa (w daltonach)	Liczba podjednostek	Zmiana objętości właściwej (ml/g)
Miozyna [28]	50×10^6	100	6×10^{-4}
Fikobilisomy z Porph. cr.	30×10^6	80	4×10^{-4}

W warunkach wysokiego ciśnienia hydrostatycznego (tab. 5) następuje dysocjacja fikobilisomów. Dla zdysocjowania fikobilisomów z *Porphyridium cruentum* konieczne są znacznie wyższe ciśnienia (nawet przy mniejszej sile jonowej roztworu), niż jest to w przypadku fikobilisomów z *Nostoc sp.* Świadczy to o tym, że wiązania PE - PE w fikobilisomach z *Porphyridium cruentum* są dużo silniejsze (lub liczniejsze) niż w fikobilisomach z *Nostoc sp.*

Z przebiegu kinetyki dysocjacji (rys. 14) wynika, że dysocjacja fikobilisomów z *Nostoc sp.* stanowi wynik nałożenia się dwóch (następujących po sobie) reakcji pierwszego rzędu z różnymi stałymi rozpadu - stąd „prosta łamana”. Taki przebieg kinetyki dysocjacji świadczy o tym, że w fikobilisomach występują dwa różne typy fikoerytryny rozmieszczone heterogennie, co proponuje schemat 1.

Jest prawdopodobne, że fikobiliproteidy fikobilisomów z *Nostoc sp.* - podobnie jak to jest w przypadku fikobilisomów z *Porphy-*



Rys. 14. Kinetyka dysocjacji fikobilisomów z *Nostoc* sp. przy ciśnieniu 1750 atm; oznaczenia jak do rys. 12

ridium cruentum - dysocjują w takiej kolejności, w jakiej są rozłożone w natywnych fikobilisomach. Stąd, zgodnie ze schematem 1, wyznaczone z rysunku 14 stałe dysocjacji wynoszą odpowiednio:

$$\text{C-PEII: } k_{\text{II}} = 3,9 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1},$$

$$\text{C-PEI } k_{\text{I}} = 2,1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}.$$

Z danych wysokociśnieniowych można wyznaczyć zmianę objętości właściwej fikobilisomów spowodowaną dysocjacją, a to z kolei daje pewną informację o ilości wiązań - np. rozerwaniu pojedynczego wiązania hydrofobowego odpowiada zmiana objętości właściwej rzędu 1-20 ml/mol. Otrzymana w pracy zmiana objętości właściwej fikobilisomów z *Porphyridium cruentum* wynosi około 1200 ml/mol i jest w bardzo dobrej zgodzie z wartością podawaną w literaturze dla miozyny [28], która ma masę cząsteczkową zbliżoną do masy cząsteczkowej fikobilisomów (tab. 6).

WNIOSKI

1. Migracja energii w układzie fikobilin w fikobilisomach odbywa się zgodnie z mechanizmem Förstera (bardzo słabe oddziaływanie dipol - dipol elektryczny).

2. Fikobiliproteidy są rozłożone w fikobilisomach warstwowo, tj. heterogennie, wg kolejności (licząc od zewnątrz): fikoerytryna, fikocyjanina i allofikocyjanina.

3. W stabilizacji struktury fikobilisomów ważną rolę odgrywają wiązania hydrofobowe.

4. Barwa światła stosowanego w czasie hodowli kultur glonowych wpływa albo na ilość syntetyzowanych fikobilisomów (np. w *Porphyridium cruentum*), bądź na skład fikobiliproteidowy (np. w *Nostoc sp.* i *Fremyella diplosiphon*).

LITERATURA

1. Gantt E., Lipschultz C.A.: *J. Cell. Biol.*, 54, 313, 1972
2. Gray B.H., Grantt E.: *Photochem. Photobiol.*, 21, 121, 1975
3. Gantt E., Lipschultz C.A., Zilinskas B.A.: *Biochim. Biophys. Acta*, 430, 375, 1976
4. Myers J., Katz W.A.: *J. Gen. Physiol.*, 39, 11, 1970
5. Engelman T.W.: *Botan. Z.*, 41, 1, 1883
6. Duysens L.N.M.: *Progr. Biophys. Mol. Biol.*, 14, 1, 1964
7. Fork D.C.: *Photosynthetic Mechanisms of Green Plants* (B. Kok, i A.T. Jagendorff, Eds.), National Research Council, Washington, 352-361, 1963
8. Emerson R., Lewis C.M.: *Am. J. Botany*, 30, 165, 1943
9. Govindjee, Papageorgiou G.: *Physiology* (Giese A.C., Ed.), Acad. Press, New York, 6, 2-26, 1971
10. Gantt E., Lipschultz C.A.: *J. Phycol.*, 13, 185, 1977
11. Wildman R.B., Bowen C.C.: *J. Bacteriol.*, 117, 886, 1974
12. Koller K.P., Wehrmeyer W., Schneider B.: *Arch. Microbiol.*, 112, 61, 1977
13. Mörschel E., Koller K.P., Wehrmeyer W., Schneider H.: *Cytobiologie (Eur. J. Cell. Biol.)*, 16, 118, 1977
14. Berns D.S.: *Plant Physiol.*, 42, 1569, 1967
15. Ohki K., Kato T.: *Plant Cell Physiol.*, 16, 53, 1975
16. Kato T., Ohki K.: *Plant Cell Physiol.*, 17, 525, 1976
17. Ohki K., Kato T.: *Photosynthetic Organelles. Special Issue of Plant Cell Physiol.*, 15-21, 1977
18. Grabowski J., Gantt E.: *Photochem. Photobiol.*, 28, 47, 1978
19. Grabowski J., Gantt E.: *Photochem. Photobiol.*, 28, 39, 1978
20. Brody S.S., Rabinowitch E.: *Science*, 125, 555, 1957
21. Kenkre V.M., Knox R.S.: *Phys. Rev. Lett.*, 33, 803, 1974
22. Förster Th. W.: *Naturwiss.*, 33, 166, 1946
23. Pearlstein R.M.: *Brookhaven Symp. Biol.*, 19, 8, 1966
24. Paillotin G.: *J. Theor. Biol.*, 58, 219, 1976
25. Grabowski J.: *Politechnika Poznańska, Seria Rozprawy*, 95, 1978

26. Suzuki K.: *Methods in Enzymology*, 27, 424, 1973
 27. Kautzman W.: *Advan. Protein Chem.*, 14, 1, 1959
 28. Harrington W.F., Kegels G.: *Methods in Enzymol.*, 27, 306, 1973

Ю. Грабовски

ФИКОБИЛИПРОТЕИДЫ И ИХ НАТУРАЛЬНЫЕ КОМПЛЕКСЫ ФИКОБИЛИСОМЫ
 (Структура и миграция энергии электронного возбуждения)

Р е з ю м е

В натуральном состоянии фикобилипротеиды являются высоко агрегированы и образуют характерные гранулы - фикобилисомы по внешним сторонам фотосинтетических ламелей. Наблюдаемый *in vivo* высокий выход передачи световой энергии поглощаемой фикобилипротеидами в хлорофилл, побуждает к предположению, что фикобилипротеиды "расположены" в фикобилисомах гетерогенно.

Целью исследований было получить информации о воздействиях, структуре и миграции энергии электронного возбуждения в фикобилисомах. В работе исследовано оптические свойства, в нормальных условиях и в условиях высокого гидростатического давления, фикобилисомов а также составляющих фикобилипротеидов *in vitro* полученных из *Porphyridium cruentum*, *Nostoc sp.*, *Fremyella Diplosiphon* и также фикобилипротеидовых комплексов полученных из фикобилисомов экстрагированных из *Porphyridium sordidum* и тоже *Rhodospirillum rubrum*

Определено экспериментальное и предусматриваемое (используя обобщенную теорию передачи энергии Кенкра и Кнокса, модели Гантт фикобилисома, а тоже результаты теоретических исследований модельных миграций энергии в молекулярных системах полученных Перльштайном и Пейотеном) среднее время передачи энергии электронного возбуждения от фикоэритрина к фикоцианину в фикобилисомах. Получено хорошее согласие между теоретическими результатами и собственными экспериментальными результатами (тоже для фикобилисомов а также результаты Говиндего, Томита и Рабиновича полученными для фикобилисомов *in vitro* На основании полученных результатов сделано следующие выводы:

- миграция энергии в системе фикобилин в фикобилисомах происходит согласно механизму Фирстера (очень слабое воздействие диполь-электрический диполь),

- фикобилипротеиды расположены в фикобилисомах слоево, по очереди (считая снаружи): фикоэритрин, фикоцианин и аллофикоцианин,

- в стабилизации структуры фикобилисомов важную роль исполняют гидрофобные связи,

- цвет света употребляемого во время культуры водорослей влияет на количество фотосинтезированных фикобилисомов нл. В *Porphyridium cruentum* или на фикобилипротеидовой состав фотосинтезированных фикобилисомов нп. В *Nostoc sp.* и *Fremyella diplosiphon*.

J. Grabowski

PHYCOBILIPROTEINS AND THEIR NATURAL COMPLEXES PHYCOBILISOMES
(The structure and electron excitation energy migration)

S u m m a r y

In the natural state phycobiliproteins are highly aggregated - they form characteristic granules: phycobilisomes, easily seen by the use of electron microscope, on photosynthetic lamellae. The observed in vivo a high efficiency of excitation energy transfer from phycobiliproteins to chlorophyll strongly suggests that phycobilisomes are heterogenous systems.

The aim of this investigation was to get information on interactions, structure and electron excitation energy migration in phycobilisomes. For that purpose the optical properties - in normal and high hydrostatic pressure - of phycobilisomes and their constituent phycobiliproteins isolated from *Porphyridium cruentum*, *Nostoc sp.* and *Fremyella diplosiphon*, as well as phycobiliproteins complexes isolated from phycobilisomes of *Porphyridium sordidum*, in vitro, were investigated.

The experimental and theoretically predicted (by the use of a generalized Kenkre and Knox relation, Gantt model of phycobilisomes and results of Pearlstein and Paillotin obtained on theoretical considerations of excitation energy migration in model systems) mean times of excitation energy transfer from phycoerythrin to phycocyanin in phycobilisomes were determined. The reasonable agreement between theoretically predicted and experimental deter-

minations for phycobilisomes both in vitro results of this investigation and in vivo results of Brody, Govindjee, Rabinowitch and Tomita was obtained.

On the base of obtained results the following main conclusions were drawn:

- the Förster mechanism (a very weak electric dipole - dipole interaction) is responsible for excitation energy migration between phycobilins in phycobiliproteins and phycobilisomes,

- phycobiliproteins are layered in phycobilisomes in a sequence (seeing from outside): phycoerythrin, phycocyanin and allophycocyanin,

- the quality of light used during culturing of algae strongly affects a concentration of phycobilisomes in cells (as it is a case with *Porphyridium cruentum*) or a phycobiliproteins composition (as it is a case with *Nostoc* sp. and *Fremyella diplosiphon*).