

Streszczenie rozprawy doktorskiej

Wykrycie wolno i szybko-relaksującej formy semichinonu w centrum Q_i cytochromu bc_1 i ich związek z reakcjami redoks w obrębie enzymu

Utlenianie ubichinolu do ubichinonu oraz redukcja ubichinonu do ubichinolu, jako reakcje dwuelektronowe, w większości miejsc aktywnych enzymów przebiegają dwuetapowo, a stanem pośrednim obu reakcji jest semichinon o charakterze wolnorodnikowym. Jeden z kluczowych enzymów dla wielu układów oddechowych i fotosyntetycznych, cytochrom bc_1 , zawiera dwa centra katalityczne: centrum utleniające ubichinol (Q_o) oraz centrum redukujące ubichinon (Q_i). Q_i jest przykładem miejsca katalitycznego, w którym jako produkt pośredni reakcji powstaje semichinon, możliwy do detekcji przy wykorzystaniu spektroskopii elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR). Dotychczasowe badania ugruntowały pogląd, że semichinon związany w miejscu Q_i (SQ_i) cytochromu bc_1 jest możliwy do obserwacji jedynie w formie o wolnej relaksacji spin-sieć, która nie oddziałuje z hemem b_H . Formę semichinonu związaną oddziaływaniem magnetycznym z utlenionym hemem b_H uważa się za niewykrywalną spektroskopowo ze względu na atyferromagnetyczny charakter tego oddziaływania. Niniejsza praca kwestionuje ten pogląd, dostarczając dowodów spektroskopowych na istnienie dwóch populacji SQ_i , dzięki wykorzystaniu metody polegającej na nasyceniu układu mocą mikrofalową. W opisanych w pracy eksperymentach, SQ_i generowano w reakcji odwrotnej, dodając syntetycznego analogu ubichinolu do próbki zawierającej cytochrom bc_1 ze związanym inhibitorem miejsca Q_o .

Wstępne eksperymenty przeprowadzone na białku typu dzikiego wykazały, że **semichinon w miejscu Q_i występuje w dwóch formach, które różnią się znacznie czasem relaksacji spin-sieć**. Pierwsza z nich charakteryzuje się długim czasem relaksacji, typowym dla rodników organicznych w roztworze. Druga forma ma bardzo krótki czas relaksacji, wskazujący na występowanie oddziaływania dipolowego z innym, metalicznym centrum paramagnetycznym. W kolejnych eksperymentach, wykorzystując muteiny ze zmodyfikowaną ligacją osiową żelaza hemowego hemów b , pokazano, że **występowanie dwóch form semichinonu jest zależne od dystrybucji elektronu w obrębie łańcucha hemów b** , ściśle związanej z równowagowymi potencjałami redoks tych hemów. Eksperymenty te zostały potwierdzone przy wykorzystaniu muteiny z zawadą steryczną w miejscu Q_o oraz z obniżonym potencjałem redoks hemu b_L . Na podstawie wyników uzyskanych przy pomocy spektroskopii EPR wywnioskowano, że **semichinon o krótkim czasie relaksacji spin-sieć jest związany oddziaływaniem z utlenionym hemem b_H** , a kiedy hem b_H jest zredukowany i diamagnetyczny, to semichinon ma długi czas relaksacji. Występowanie dwóch form SQ_i w białku typu dzikiego okazało się nie być możliwe do wyjaśnienia na podstawie podanych w literaturze równowagowych potencjałów redoks hemów b .

W kolejnym etapie badań, przeprowadzono eksperymenty miareczkowania potencjometrycznego hemów *b* w poszczególnych wariantach cytochromu *bc₁*, które pozwoliły powiązać własności magnetyczne SQ_i z potencjałami redoks hemów. Wykazano, że wiązanie inhibitorów do miejsc aktywnych znacząco wpływa na wartości równowagowych potencjałów redoks hemów i w konsekwencji zmienia dystrybucję elektronów na łańcuchu *b*. Wiązanie antymycyny do miejsca Q_i powoduje obniżenie potencjału obu hemów, natomiast wiązanie myksotiazolu w miejscu Q_o podnosi potencjał hemu *b_L*. Dokładna analiza widm EPR hemów pozwoliła również określić zmiany spektralne wywołane obecnością inhibitorów lub substratu w miejscach aktywnych.

Wyniki eksperymentów przedstawione w pracy wymuszają zmianę spojrzenia na oddziaływanie semichinonu w miejscu Q_i z hemami łańcucha niskopotencjałowego. Dodatkowo, zmiany potencjałów oraz własności spektralnych hemów *b* pod wpływem inhibitorów pozwalają wysnuć przypuszczenie, że wiązanie substratów do miejsc aktywnych również wpływa na potencjały redoks hemów i może mieć istotne znaczenie dla funkcjonowaniu enzymu.

Część wyników zawartych w rozprawie została opublikowana w pracy:

Pintscher, S., Kuleta, P., Cieluch, E., Borek, A., Sarewicz, M., Osyczka, A. (2016) Tuning of hemes *b* equilibrium redox potential is not required for cross-membrane electron transfer. *The Journal of Biological Chemistry* 291, 6872-6881

Większość wyników prezentowanych w rozprawie doktorskiej nie została jeszcze opublikowana.

Sebastian Fiedor