

Ewelina Cieluch

Streszczenie rozprawy doktorskiej pt.

**MECHANIZM ZMIAN DYNAMICZNEJ DYSTRYBUCJI ELEKTRONÓW
W ŁAŃCUCHACH KOFAKTORÓW CYTOCHROMU bc_1 BADANY PRZY UŻYCIU
IMPULSOWEJ SPEKTROFOTOMETRII DWUWIĄZKOWEJ**

Kompleks bc_1 (cytochrom bc_1 , oksydoreduktaza Q:cytochrom c) jest jednym z najbardziej uniwersalnych składników łańcuchów transportu elektronów, zarówno u organizmów prokariotycznych jak i eukariotycznych. Katalizuje on transfer elektronów między błonową pulą chinonu a pozabłonową pulą cytochromu c . Proces ten związany jest z translokacją protonów w poprzek błony, a to z kolei przyczynia się do generowania siły protonomotorycznej potrzebnej do syntezy ATP. Transport elektronów przez kompleks bc_1 zachodzi za pośrednictwem kofaktorów ułożonych w dwa liniowe łańcuchy, związane z dwoma centrami katalitycznymi białka, Q_o i Q_i . Łańcuch c składa się z białka Fe-S, hemu c_1 i cytochromu c . Łańcuch b zawiera hemy b_L i b_H oraz chinon w centrum Q_i . Oba łańcuchy wiąże ze sobą reakcja bifurkacji elektronów, zachodząca w centrum katalitycznym Q_o w czasie, której dochodzi do utleniania cząsteczki chinolu (dwuelektronowy przekaźnik) i przekazania jednego elektronu na łańcuch c a drugiego na łańcuch b .

W prezentowanej rozprawie doktorskiej postawiono sobie za cel zbadanie, na poziomie molekularnym, sposobu sprzężenia łańcucha c z łańcuchem b w reakcjach transportu elektronów i protonów w cytochromie bc_1 . Zagadnienie to jest istotne z tego względu, że leży to u podstaw wydajności energetycznej enzymu, podtrzymując fizjologicznie korzystne reakcje, zabezpieczając jednocześnie przed niekorzystnymi energetycznie reakcjami rozprzegającymi układ. Obecnie istnieją dwie podstawowe koncepcje działania enzymu opisujące sposób tego sprzężenia. Pierwsza z nich postuluje, że wszystkie etapy transferu elektronów w cytochromie bc_1 to ciąg reakcji odwracalnych w skali milisekund i wypadkowy kierunek przepływu elektronów przez łańcuchy kofaktorów jest następstwem przesunięć równowagowych zachodzących w toku następujących po sobie reakcji cząstkowych. Druga, całkowicie odmienna koncepcja zakłada, iż przepływ elektronów/protonów przez białko jest kontrolowany allosterycznie. W tym przypadku sprzężenie łańcuchów kofaktorów ma inny charakter, bowiem poszczególne reakcje w jednym łańcuchu mogą kontrolować przebieg reakcji w drugim łańcuchu. Aby rozstrzygnąć, który z modeli lepiej opisuje mechanizm transferu elektronów przez cytochrom bc_1 zanalizowano kinetykę transferu elektronów dla szeregu pochodnych cytochromu bc_1 , w których wprowadzono barierę termodynamiczną w postaci zmienionego potencjału

oksydoredukcyjnego wybranych kofaktorów. Uzyskano i scharakteryzowano muteiny kompleksu bc_1 o zmienionych własnościach oksydoredukcyjnych zarówno hemu c_1 w łańcuchu c, jaki i hemów b_L i b_H w łańcuchu b.

Zmutowane białka, dotąd nieopisane, wymagały analizy własności spektralnych, m.in. widm optycznych i elektronowego rezonansu paramagnetycznego hemów, pomiarów aktywności enzymatycznej, oznaczenia potencjałów oksydoredukcyjnych poszczególnych kofaktorów. W pracy naświetlono własności muteiny A181T cytochromu c_1 - pochodnej muteiny pozbawionej mostka dwusiarczkowego w strukturze cytochromu c_1 , w której dochodzi do rewersji przywracającej potencjał hemu c_1 do funkcjonalnej wartości oraz szeregu mutein cytochromu b ze zmienionym sposobem koordynacji żelaza hemowego hemów B. Mutacje cytochromu b to jedne z nielicznych mutacji, w których zmieniono z sukcesem koordynację His-His na His-Met lub His-Lys w białku błonowym. Są to również pierwsze mutacje, w których uzyskano cytochrom bc_1 z hemami B o zmienionych właściwościach spektralnych i pierwsze opisane modyfikacje, które prowadzą do wzrostu potencjału redoks w obrębie hemów B cytochromu bc_1 , co skutkuje znaczącą zmianą w profilu termodynamicznym łańcucha b w najbliższym sąsiedztwie centrów katalitycznych Q_o i Q_i .

Dla białka dzikiego oraz uzyskanych mutein wykonano analizę porównawczą kinetyki utleniania/redukcji kofaktorów kompleksu bc_1 po aktywacji bakteryjnego centrum reakcji błyskiem światła. Otrzymane wyniki opowiadają się za mechanizmem działania enzymu, w którym przesunięcie równowagi jednej z reakcji cząstkowych przesuwają równowagę wszystkich pozostałych reakcji w obu łańcuchach kofaktorów kompleksu bc_1 . W tak sprzężonym systemie, dystrybucja elektronów w jednym z łańcuchów wpływa na dystrybucję elektronów w drugim łańcuchu. Aby to umożliwić, wszystkie reakcje muszą być kinetycznie sprzężone i odwracalne w skali czasowej rzędu milisekund. Mechanizm tego sprzężenia nie wymaga istnienia żadnych dalekozasięgowych oddziaływań między oboma łańcuchami kofaktorów, które kontrolowałyby specyficznie kolejne etapy transferu elektronów w cytochromie bc_1 . Prezentowane wyniki wskazują zatem, że to model kinetyczny a nie model oddziaływań allosterycznych lepiej opisuje działanie cytochromu bc_1 .