

Streszczenie rozprawy doktorskiej:

**Mechanizm produkcji anionorodnika ponadtlenkowego przez cytochrom bc_1
badany poprzez modyfikację poszczególnych etapów przepływu elektronów
w łańcuchach kofaktorów**

Cytochrom bc_1 jest białkiem łańcucha transportu elektronów. Jego działanie związane jest z budowaniem siły protonomotorycznej służącej do produkcji ATP. Oprócz reakcji katalitycznych (które konserwują energię), w pewnych warunkach mogą zachodzić reakcje uboczne, które prowadzą do dyssypacji energii. W reakcjach katalitycznych energia związana z przepływem elektronów z chinolu na cytochrom c jest wykorzystywana do translokacji protonów w obrębie cytochromu bc_1 . W tym przypadku, w miejscu katalitycznym Q_0 następuje rozdział dwóch elektronów dostarczanych przez chinol, które przepływają przez dwa odrębne łańcuchy kofaktorów. W reakcjach ubocznych, w konsekwencji może nastąpić utrata części energii z utleniania chinolu. Może być ona „rozproszona” na skutek częściowej lub całkowitej utraty funkcji translokacji protonów przez cytochrom bc_1 . Są to reakcje, w których w miejscu katalitycznym Q_0 nie następuje wydajny rozdział elektronów na dwa łańcuchy kofaktorów. Jedną z reakcji ubocznych jest przekaz elektronu z semichinonu w miejscu Q_0 na tlen z wytworzeniem anionorodnika ponadtlenkowego. W wyniku tej reakcji oprócz spadku wydajności translokacji protonów, powstaje reaktywny rodnik, który może prowadzić do dużych uszkodzeń w komórce poprzez utlenianie różnych cząsteczek, takich jak lipidy i białka.

W pracy doktorskiej zostały przebadane zarówno reakcje katalityczne jak i reakcje uboczne. Praca doświadczalna nad poznaniem tych reakcji została wzbogacona pełnym teoretycznym modelem działania monomeru cytochromu bc_1 . Model ten umożliwia poznanie działania cytochromu bc_1 oraz przewidywanie zachowania się badanego układu w różnych warunkach stężenia substratów i produktów, jak i efektu kinetycznego łączenia mutacji w obrębie tego białka. W modelu tym kluczową podjednostką „sterującą” działaniem cytochromu bc_1 jest białko żelazowo-siarkowe (ISP). Białko ISP wykonuje ruch między podjednostkami: cytochrom b i cytochrom c_1 . W zaproponowanym modelu ruch białka ISP został opisany za pomocą stałych szybkości reakcji, natomiast wartości tych stałych zostały powiązane z frakcją białka ISP w różnych położeniach: blisko cytochromu b (pozycja b), blisko cytochromu c_1 (pozycja c) i położenie pośrednie (między pozycją b a pozycją c). Na podstawie wyników aktywności i wartości frakcji białka ISP w pozycji b oszacowano stałą szybkości reakcji w miejscu Q_0 . W pracy doktorskiej przedstawiono również dowody na mechanizm reakcji w miejscu Q_0 . Zakłada on mechanizm jednoczesnego przekazu elektronów na łańcuchy wysokopotencjałowy i niskopotencjałowy podczas utleniania chinolu w centrum Q_0 .

Oprócz inhibicji kompetycyjnej produktem, przez chinon w miejscu Q_0 , innej możliwej kompetycji produktem, przez chinol w miejscu Q_i , w cytochromie bc_1 dochodzi również do inhibicji wywołanej chinolem a związanej z dostarczaniem elektronów na łańcuch niskopotencjałowy. Inhibicja ta zachodzi zgodnie z mechanizmem „slow binding”. Zaobserwowano, że inhibicja wywołana chinolem jest powiązana z czasem przebywania hemu b_L w stanie zredukowanym. Długi czas przebywania hemu b_L w stanie zredukowanym powoduje odsunięcie się białka ISP w kierunku cytochromu c_1 . Takie przesunięcie powoduje drastyczny spadek aktywności cytochromu bc_1 .

W pracy doktorskiej przedstawiono mechanizm produkcji anionorodnika ponadtlenkowego przez cytochrom bc_1 oraz opisano reakcje, które zapobiegają produkcji rodników przez to białko. Produkcja anionorodnika ponadtlenkowego jest związana z transferem elektronu z semichinonu powstałego w miejscu katalitycznym Q_o na tlen. Na podstawie uzyskanych wyników udowodniono, że główną reakcją odpowiedzialną za powstawanie semichinonu w miejscu Q_o jest reakcja transferu elektronu ze zredukowanego hemu b_L na chinon w miejscu Q_o . W pracy przedstawiono również warunki, w których zaobserwowano zmniejszoną produkcję rodników. Tym zabezpieczeniem jest obecność utlenionego białka ISP w pozycji b, a główną reakcją powodującą zneutralizowanie semichinonu w miejscu Q_o jest przekaz elektronu z semichinonu na utlenione białko ISP.

W kontekście omawianego mechanizmu działania cytochromu bc_1 w pracy doktorskiej zostały zaproponowane molekularne efekty wybranych mutacji mitochondrialnych. Najciekawszą mutacją chorobotwórczą okazała się mutacja S151P, której odpowiednikiem w bakterii *Rb. capsulatus* jest mutacja G167P. W pracy doktorskiej na podstawie bakteryjnego modelu została wyjaśniona przyczyna niskiej wydajności działania ludzkiego cytochromu bc_1 z mutacją chorobotwórczą S151P. Mutacja ta powoduje odsunięcie białka ISP w kierunku cytochromu c_1 , co powoduje wyraźny spadek aktywności cytochromu bc_1 oraz znaczną produkcję anionorodnika ponadtlenkowego nawet podczas nieobecności inhibitora miejsca Q_i , antymycyny.

Mimo, że badania nad mechanizmem działania cytochromu bc_1 trwają już kilkadziesiąt lat, to mechanizm działania cytochromu bc_1 nie został do końca poznany. Wciąż nie są poznane szczegóły mechanizmu działania tego białka, takie jak mechanizm reakcji w miejscu Q_o (sekwencyjny, czy jednoczesny), czy reakcje związane z produkcją rodników. Praca doktorska podejmuje próbę odpowiedzi na te pytania. Ponieważ praca ta jest zarówno doświadczalną jak i teoretyczną, większość wyników przedstawionych w pracy została przedyskutowana w kontekście zaproponowanych mechanizmów. Pełny model działania cytochromu bc_1 i produkcji rodników stanowi cenne narzędzie do kinetycznego opisu efektów różnych mutacji występujących w obrębie cytochromu bc_1 .