

STRESZCZENIE PRACY DOKTORSKIEJ O TYTULE:

Dystrybucja przestrzenna białek opisana przez intermolekularne oddziaływania magnetyczne w układzie cytochrom c_2 — cytochrom bc_1

Proces transferu elektronu pomiędzy cytochromem c i cytochromem bc_1 (mitochondrialny kompleks III) jest ważnym etapem w łańcuchu transportu elektronów organizmów pro- i eukariotycznych. Z dostępnych wyników badań wiadomo, że oddziaływania elektrostatyczne umożliwiają fizyczny kontakt tych dwóch białek, zapewniając wydajność transferu elektronu na odpowiednim poziomie. Niniejsza praca rzuca nowe światło na proces tworzenia się kompleksu tych białek poprzez analizę ich wzajemnego przestrzennego ułożenia za pomocą technik impulsowej spektroskopii elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR). W badaniach tych stosowano natywne i zmutowane formy cytochromu c_2 i cytochromu bc_1 wyizolowane z bakterii purpurowych *Rhodobacter capsulatus*.

Pierwszym etapem badań było zdefiniowanie i opisanie w sposób ilościowy intermolekularnej wielkości spektroskopowej pozwalającej na specyficzne monitorowanie procesu tworzenia kompleksu cytochromu c_2 z cytochromem bc_1 . W tym celu wykorzystano odległościowo-zależny efekt przyspieszenia relaksacji spinu elektronowego na znaczniku spinowym przyłączonym do cytochromu c_2 przez szybko-relaksujący spin hemu c_1 , który jest kofaktorem cytochromu bc_1 . Efekt ten jest łatwo mierzalny i manifestuje się w próbkach jako dodatkowy kanał relaksacyjny powodujący skrócenie czasu relaksacji spin-sieć (T_1) znacznika spinowego, gdy oba białka tworzą kompleks w niskiej sile jonowej.

Wykorzystane zostały dwie muteiny cytochromu c_2 wyznakowane znacznikiem w pozycji 101 oraz 68. W modelowej konfiguracji oddziaływania pozycja 101 znajduje się prawie dwa razy bliżej hemu c_1 niż pozycja 68. W związku z tym oczekiwano różnic w czasach relaksacji, co znalazło potwierdzenie w mierzonych eksperymentalnie wartościach.

Manipulacje stanem spinowym hemu c_1 oraz pozostałych kofaktorów cytochromu bc_1 poprzez zmiany ich stanów redoks pozwoliły na jednoznaczne zdefiniowanie źródła obserwowanych oddziaływań magnetycznych. Dodatkowo wyniki pomiarów w układzie cytochrom c_2 – cytochrom c_1 zestawiono ze zmierzonym przyspieszeniem relaksacji w układzie wewnątrz-molekularnym, gdzie znacznik spinowy oddziaływał z utlenionym hemem cytochromu c_2 . Pozwoliło to na wyznaczenie swoistej linijki molekularnej obrazującej wielkość przyspieszenia relaksacji od średnich odległości międzyspinowych w tych układach. Ponadto dokładne symulacje efektu przyspieszenia relaksacji

spin-sieć znacznika spinowego pozwoliły na oszacowanie szybkości relaksacji niskospinowego żelaza hemu w cytochromie c_2 dla temperatur bliskich temperaturze ciekłego azotu.

Zdefiniowanie własności układu wyznakowany cytochrom c_2 – hem c_1 pozwoliło na przeprowadzenie eksperymentu miareczkowania ilości miejsc wiązania cytochromu c_2 na cytochromie bc_1 . Uzyskane krzywe miareczkowania wraz ze wzrastającym stężeniem cytochromu bc_1 wykazują wysycenie, co potwierdza specyficzność metody. Punkty końcowe miareczkowań przeprowadzonych w różnych wartościach siły jonowej pozwoliły na oszacowanie średnich odległości znacznik – hem c_1 w stanie stacjonarnego związania wszystkich cząsteczek cytochromu c_2 przez cytochrom bc_1 .

Wyniki miareczkowania wskazały również, że przy cytochromie bc_1 — w pobliżu domeny wiążącej cytochrom c_2 — może gromadzić się kilka cząsteczek cytochromu c_2 , kiedy cytochrom c_2 jest w dużym nadmiarze nad cytochromem bc_1 , a oddziaływania elektrostatyczne między tymi białkami są silne (niskie stężenie soli). Przeprowadzona szczegółowa analiza eksperymentalna za pomocą metody podwójnego rezonansu elektronowo-elektronowego (DEER) pozwoliła na bezpośrednie potwierdzenie obecności „chmury” cząsteczek cytochromu c_2 skupionych w pobliżu cytochromu bc_1 . Postulowanym wyjaśnieniem tego efektu jest fakt, że silne pole elektrostatyczne powoduje utworzenie lokalnych skupisk cytochromu c_2 w pobliżu miejsca wiążącego na cytochromie c_1 .

Przedstawione w pracy efekty spektroskopowe obserwowane za pomocą impulsowych metod elektronowego rezonansu paramagnetycznego pozwoliły na gruntowne opisanie oddziaływania cytochromu c_2 z cytochromem bc_1 przy specyficzności i rozdzielczości przestrzennej nieosiągalnej dla innych metod. Wyniki pracy ukazują obraz oddziaływania cytochromu c_2 z cytochromem bc_1 , w którym białka te w warunkach fizjologicznych tworzą krótkożyjące kompleksy, a efektywny transfer elektronu zachodzi między nimi według mechanizmu sprzężonego dyfuzyjnie.

Część wyników prezentowanych w rozprawie doktorskiej została opublikowana w artykule:

Pietras, R., Sarewicz, M., & Osyczka, A. (2014) Molecular organization of cytochrome c_2 near the binding domain of cytochrome bc_1 studied by electron spin-lattice relaxation enhancement. *J. Phys. Chem. B*, 118, 6634-6643