Załącznik 3a

Autoreferat

dr Marcin Sarewicz
Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii
Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

1. Imię i nazwisko: Marcin Mikołaj Sarewicz

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/~~artystyczne~~ – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

a) Tytuł magistra

- **Data uzyskania:** czerwiec 2003
- **Tytuł pracy:** Melaniny jako endogenne środki kontrastujące w tomografii MRJ.
- **Kierunek:** biotechnologia w zakresie biofizyka
- **Miejsce realizacji pracy:** Zakład Biofizyki Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie; Zakład Tomografii Magnetyczno-Rezonansowej Instytutu Fizyki Jądrowej im. Henryka Niewodniczańskiego Polskiej Akademii Nauk w Krakowie; Zakład Radiospektroskopii Wydziału Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie
- **Promotor:** prof. dr hab. Stanisław Łukiewicz
- **Jednostka przyznająca:** Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

b) Stopień doktora nauk biologicznych

- **Data uzyskania:** 14 listopada 2008
- **Tytuł pracy:** Badanie oddziaływania cytochromu *c* z kompleksem cytochromu bc_1 metodą elektronowego rezonansu paramagnetycznego
- **Specjalność:** biofizyka
- **Miejsce realizacji pracy:** Zakład Biofizyki Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie
- **Promotor:** prof. dr hab. Wojciech Froncisz
- **Recenzenci:** prof. dr hab. Grzegorz Bartosz , dr hab. Ryszard Gurbiel
- **Jednostka przyznająca:** Rada Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

Okres zatrudnienia	Stanowisko	Miejsce zatrudnienia
2010 - obecnie	adiunkt	Zakład Biofizyki Molekularnej Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie
2008-2010	asystent naukowy	Zakład Biofizyki Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii, Uniwersytet Jagielloński w Krakowie

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595 ze zm.)

a) Tytuł osiągnięcia naukowego:

Rola białka Rieske'go w mechanizmie utleniania hydrochinonu przez enzymy z rodziny cytochromów *bc*.

b) Autor/autorzy, tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa

Cykl publikacji stanowiących podstawę postępowania habilitacyjnego obejmuje 4 prace doświadczalne oraz 2 prace przeglądowe (w kolejności daty ich publikacji).

1. Sarewicz M.,*, Dutka M., Froncisz W., Osyczka A.* (2009) Magnetic interactions sense changes in distance between heme b_L and the iron-sulfur cluster in cytochrome bc_1. *Biochemistry*, 48, 5708-5720.

IF_{2017} = 2,997, IF_{5lat} = 2,852	MNiSW = 25	Liczba cytowań: 22

2. Sarewicz M., Dutka M., Pintscher S., Osyczka A.* (2013) Triplet state of the semiquinone-Rieske cluster as an intermediate of electronic bifurcation catalyzed by cytochrome bc_1. *Biochemistry*, 52, 6388-6395.

IF_{2017} = 2,997, IF_{5lat} = 2,852	MNiSW = 25	Liczba cytowań: 21

3. Sarewicz M., Dutka M., Pietras R., Borek A., Osyczka A.* (2015) Effect of H bond removal and changes in the position of the iron-sulphur head domain on the spin-lattice relaxation properties of the $[2Fe\text{-}2S]^{2+}$ Rieske cluster in cytochrome bc_1. *Physical Chemistry and Chemical Physics*, 17, 25297-25308.

IF_{2017} = 3.906, IF_{5lat} = 4,224	MNiSW = 40	Liczba cytowań: 9

4. Sarewicz M., Osyczka A.* (2015) Electronic connection between the quinone and cytochrome *c* redox pools and its role in regulation of mitochondrial electron transport and redox signaling. *Physiological Reviews*, 95, 219-243 (artykuł przeglądowy).

IF_{2017} = 24.014, IF_{5lat} = 34,299	MNiSW = 50	Liczba cytowań: 34

5. Pietras R., Sarewicz M., Osyczka A.* (2016) Distinct properties of semiquinone species detected at the ubiquinol oxidation Qo site of cytochrome bc_1 and their mechanistic implications. *Journal of the Royal Society Interface,* 13, 20160133. (artykuł przeglądowy).

$IF_{2017} = 3.355$, $IF_{5lat} = 4.216$	MNiSW = 40	Liczba cytowań: 9

6. Sarewicz M., Bujnowicz Ł., Osyczka A.* (2018) Generation of semiquinone-$[2Fe\text{-}2S]^+$ spin-coupled center at the Q_o site of cytochrome bc_1 in redox-poised, illuminated photosynthetic membrane membranes from *Rhodobacter capsulatus. Biochimica at Biophysica Acta – Bioenergetics*, 1859, 145-153.

$IF_{2017} = 4.280$, $IF_{5lat} = 4.785$	MNiSW = 35	Liczba cytowań: 1

* Autor korespondencyjny

Sumaryczny IF prac stanowiących podstawę habilitacji: 41,549
Sumaryczna punktacja MNiSW: 215
Liczba cytowań: 96 (dane na dzień 08.01.2019 z bazy *Web of Science*)

c) Omówienie celu naukowego/~~artystycznego~~ ww prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Zwięzła prezentacja wyników, stanowiących podstawę postępowania habilitacyjnego

Wstęp

Cytochrom bc_1 jest jednym z centralnych enzymów szlaku transportu elektronów zachodzącym w mitochondriach podczas oddychania tlenowego [1–3]. W literaturze dotyczącej szczegółów molekularnych funkcjonowania łańcucha oddechowego eukariontów często można spotkać się z alternatywnym określeniem tego enzymu jako kompleks III [4]. Należy jednak zaznaczyć, iż określenie cytochrom bc_1 i kompleks III można stosować wymiennie jedynie w przypadku komórek eukariotycznych. Enzym ten występuje nie tylko w mitochondriach lecz jest powszechny również u bakterii, gdzie jest on jednym z kluczowych elementów szlaków oddychania tlenowego oraz anoksygenicznej fotosyntezy cyklicznej [5]. W chloroplastach roślin występuje enzym o nazwie cytochrom b_6f, którego cechuje bardzo duże podobieństwo do cytochromu bc_1 zarówno na poziomie strukturalnym jak i funkcjonalnym [6]. Stąd też w stosunku do tych enzymów przyjęto zbiorcze określenie - enzymy z rodziny cytochromów *bc*.

Główną rolą enzymów z rodziny cytochromów *bc* jest transfer elektronów z błonowej puli hydrofobowych przenośników elektronów takich jak ubihydrochinon, menahydrochinon czy plastohydrochinon (nazywanych pulą chinonów lub pulą Q) na rozpuszczalne, jednoelektronowe przenośniki białkowe jakim są najczęściej cytochromy *c* lub, w przypadku chloroplastów, plastocyjanina. Przenośniki te najczęściej określa się mianem puli *c*. Różnica w potencjałach redoks

pomiędzy pulami Q i *c* jest źródłem energii, która podczas transferu elektronu jest w większości wykorzystana przez ten enzym na wykonanie pracy związanej z przeniesieniem protonów w poprzek dwuwarstwy lipidowej [3]. W ten sposób cytochromy *bc* wnoszą istotny i bezpośredni wkład w wytwarzanie tzw. siły protono-motorycznej, która jest zdecydowanie najważniejszym źródłem energii niezbędnej do syntezy ATP przez komórki żywych organizmów. Jednocześnie należy zwrócić uwagę na interesujący fakt związany z generowaniem siły protono-motorycznej przez cytochromy *bc*. Transport protonów w poprzek błony w tym przypadku nie zachodzi zgodnie z mechanizmem typowym dla aktywnych białkowych pomp protonowych lecz jest wynikiem sprzężenia pomiędzy dwiema reakcjami: a) utleniania, podczas której zachodzi deprotonacja ubi-, mena- czy plastohydrochinonu (nazywanych dalej skrótem QH_2) po jednej stronie błony oraz b) redukcją odpowiednich form chinonowych (określanych dalej skrótem Q) czemu towarzyszy protonacja cząsteczek po drugiej stronie błony. Mówiąc w sposób bardzo skrótowy faktycznym przenośnikiem protonów jest w tym przypadku nie pompa protonowa, lecz pula swobodnie dyfundujących w błonie cząsteczek chinonów.

Wieloletnie badania nad tym enzymem wykazały istnienie szeregu unikalnych cech związanych z mechanizmem katalizy, które nie występują w innych kompleksach bioenergetycznych. Z historycznego punktu widzenia do obecnego stanu wiedzy związanej z mechanizmem utleniania puli Q i redukcji puli *c* doprowadziły następujące odkrycia, które stanowią istotne kroki w zrozumieniu mechanizmu działania tego enzymu. W kolejności czasu ich dokonań są to: a) obserwacja procesu wywołanej utleniaczem redukcji hemów *b* [7]; b) zaproponowanie mechanizmu bifurkacji elektronów w miejscu Q_o [8,9] ; c) wykrycie produkcji anionorodnika ponadtlenkowego przez cytochrom bc_1 [10–13]; d) rozwiązanie struktury krystalograficznej cytochromu bc_1 oraz b_6f [14–17]; e) wykrycie obecności wielkoskalowego ruchu domeny wiążącej klaster żelazowo-siarkowy 2Fe-2S typu Rieskego (określany dalej skrótem Fe-S) pomiędzy miejscem utleniania QH_2 (miejsce Q_o) a podjednostką cytochromu c_1 [18,19]; f) zwrócenie uwagi, iż zgodnie z aktualnym stanem wiedzy istnieje zasadniczy problem związany z istnieniem całkowitego sprzężenia między dwoma łańcuchami kofaktorów: hemami *b* oraz Fe-S i hemem c_1, przy jednoczesnym braku występowania tzw. „spięć elektrycznych" między łańcuchami (ang. short-circuit reactions) [20,21] i wreszcie g) zaproponowanie modelu z zakładającego istnienie niestabilnego semichinonu w miejscu Q_o, który jest niewykrywalny przy użyciu spektroskopii EPR [22–25].

Podczas dotychczasowej pracy naukowej moja uwaga poświęcona była zagadnieniom związanym ze zrozumieniem molekularnych mechanizmów utleniania QH_2 w miejscu katalitycznym Q_o cytochromu bc_1, roli ruchu domeny wiążącej Fe-S w katalizie oraz jego związku z produkcją reaktywnych form tlenu (w skrócie ROS) i z wyjaśnieniem szczegółów bifurkacji elektronów w obrębie miejsca Q_o w trakcie utleniania QH_2. W związku z tym w mojej pracy szczególną uwagę zwróciłem na zbadanie własności relaksacji paramagnetycznej oraz widm fali ciągłej klastra żelazowo-siarkowego, którego naturalne występowanie w strukturze cytochromu bc_1 stanowi doskonałą sondę odzwierciedlającą nie tylko subtelne zmiany konfiguracji elektronowej w obrębie miejsca katalitycznego Q_o, ale również pozwala na obserwację zmian strukturalnych na poziomie całej domeny białka żelazowo-siarkowego.

Opracowanie metody średniego, względnego określania położenia domeny wiążącej klaster Fe-S metodą impulsowej spektroskopii elektronowego rezonansu paramagnetycznego EPR.

(Zwięzły opis prac przedstawionych w publikacji: Magnetic interactions sense changes in distance between heme b_L and the iron-sulfur cluster in cytochrome bc_1. (2009), *Biochemistry*, 48, 5708-5720.)

W czasie powstawania pierwszych struktur krystalograficznych cytochromu bc_1 okazało się, że niemożliwe jest rozwiązanie struktury podjednostki białka żelazowo-siarkowego ze względu na znaczne nieuporządkowanie pozabłonowej domeny wiążącej klaster Fe-S (domeny ISP) [14]. Dopiero rozwiązanie struktur krystalograficznych uzyskanych w obecności inhibitora stigmateliny pozwoliły na określenie struktury tej domeny. Wyniki krystalograficzne pozwoliły na stwierdzenie, że zgodnie z teorią wykładniczego spadku szybkości transferu elektronu wraz ze wzrostem odległości pomiędzy donorem a akceptorem [26,27], transfer elektronu pomiędzy klastrem a hemem c_1 jest niemożliwy w skali czasowej typowej dla mierzonych szybkości redukcji cytochromów *c*. Późniejsze badania krystalograficzne oraz spektroskopowe wykazały, iż transfer elektronu z Fe-S na hem c_1 wymaga, aby domena ISP wykonała wielkoskalowy ruch rzędu 1 nm względem odległości od jonu żelaza hemu b_L z położenia bliskiego miejsca utleniania QH_2 do miejsca bliskiego hemu c_1 (rys. 1) [18].

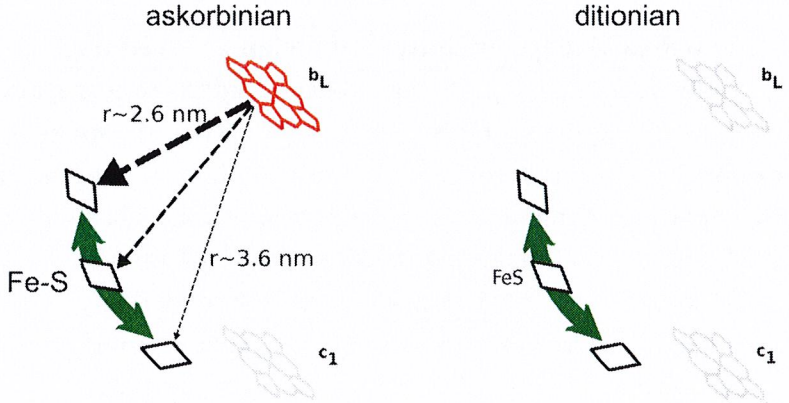
Bezpośrednie strukturalne badanie zmian położenia domeny ISP wymagały tego, aby próbki zawierające cytochrom bc_1 znajdowały się w stanie makroskopowego uporządkowania. W praktyce istniały dwie metody odpowiedniego przygotowania takich próbek. Pierwsza metoda opierała się o krystalografię rentgenowską, która to metoda w zasadzie wykluczała badanie efektów wpływu mutacji na ruch domeny na modelach bakteryjnych, ze względu na trudności w uzyskaniu kryształów bakteryjnych cytochromów bc_1 bez dodatku stigmateliny, której obecność wymusza tylko jedno położenie domeny ISP tj. przy miejscu Q_o [28]. Alternatywną metodą był pomiar kątowej zależności amplitud linii sygnałów EPR związanych z rombową symetrią tensora magnetycznego zredukowanego klastra Fe-S na cytochromie bc_1 znajdującego się w błonie lipidowej uporządkowanych, wysuszonych stosów chromatoforów [29–33]. Obie te metody, poza typowymi dla siebie ograniczeniami, posiadały jeszcze jedną wspólną wadę - niemożność zbadania enzymu w stanie innym niż w równowadze czyli np. podczas reakcji katalitycznej.

Podczas moich badań zaobserwowano, że w czasie pomiarów sygnałów klastra Fe-S metodą EPR izolowanego cytochromu bc_1 pochodzącego z bakterii *Rhodobacter capsulatus* amplituda widma uzyskanego metodą echa spinowego (ED-EPR) jest niemal dwukrotnie niższa w sytuacji gdy próbka jest zredukowana askorbinianem sodu (powodującym redukcje Fe-S oraz hemu c_1) niż w przypadku gdy do próbki analogicznie przygotowanej dodany zostanie ditionian sodu (powodujący redukcje wszystkich kofaktorów cytochromu bc_1). W przypadku konwencjonalnego pomiaru z użyciem fali ciągłej (CW-EPR) nie obserwowano takich różnic, niezależnie od użytej mocy mikrofalowej [34]. Na tej podstawie wywnioskowano, iż **przyczyną różnic w amplitudach sygnału muszą być znaczne zmiany w czasie relaksacji fazowej klastra Fe-S w zależności od stanu redoks cytochromu, a co za tym idzie także paramagnetyzmu hemów *b*** (rys 1).

Ze względu na odległość od klastra oraz większą w stosunku do hemu b_H szybkość relaksacji spinowo-sieciowej jonu żelaza hemu b_L, ten drugi jest najbardziej prawdopodobnym kandydatem na

centrum paramagnetyczne powodujące dominujący efekt skrócenia czasu pamięci fazowej Fe-S [35–38]. Przypuszczenie to zostało potwierdzone w eksperymentach kontrolnych z częściową redukcją hemu b_H przy użyciu syntetycznego substratu QH_2.

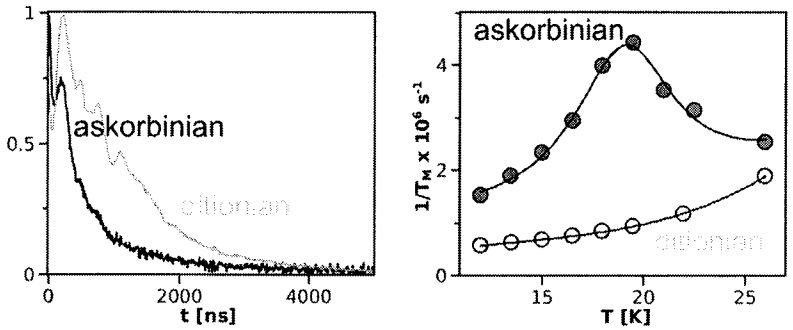
W ramach pracy analizowano zależność temperaturową szybkości relaksacji fazowej Fe-S dla izolowanej formy cytochromu bc_1 bez i w obecności inhibitorów miejsca Q_o (myksotiazol, stigmatelina) oraz Q_i (antymycyna) [19,39,40]. **Zaobserwowano charakterystyczny wzrost, a następnie spadek szybkości relaksacji fazowej z obserwowanym minimum w zakresie temperatur ok. 19 K, gdzie występuje zbliżenie szybkości relaksacji ($1/T_1^{bl}$) żelaza hemowego hemu b_L do wielkości rozszczepienia dipolowego (Δ) Fe-S na hemie b_L, wyrażonego w jednostce częstotliwości.** Przykładowe dane uzyskane dla cytochromu bc_1 pochodzącego z dzikiego szczepu bakterii *R. capsulatus,* w obecności stigmateliny przedstawiono na rysunku 2. Stwierdzono, że czas pamięci fazowej Fe-S skraca się w badanym enzymie stopniowo dla próbek przygotowanych w obecności: 1) myskotiazolu i antymycyny łącznie; 2) antymycyny; 3) myksotiazolu; 4) braku inhibitorów oraz 5) stigmateliny. Różnice te wynikają ze zmian w wielkości członu dipolowego Δ spowodowanych zmianą długości wektora łączącego centrum Fe-S oraz żelaza hemowego, a także zmian wzajemnych orientacji tensorów magnetycznych obu tych centrów spowodowanych ruchem domeny ISP. Był to pierwszy bezpośredni dowód strukturalny na to, że inhibitor miejsca Q_i (antymycyna) powoduje zmiany w dystrybucji położeń domeny ISP. Jednocześnie były to pierwsze obserwacje bezpośrednich zmian strukturalnych w cytochromie bc_1 znajdującym się w stanie rozpuszczonym w zamrożonym roztworze, bez konieczności tworzenia makroskopowego uporządkowania cząsteczek enzymu.



Rys. 1. Schematyczne przedstawienie położenia klastra Fe-S względem hemów b_L i c_1. Ruch domeny ISP miedzy pozycją Q_o a pozycją c_1 przedstawiono zieloną strzałką. W przypadku redukcji askorbinianem tylko Fe-S i żelazo hemu b_L pozostają paramagnetyczne. W przypadku redukcji ditionianem tylko Fe-S pozostaje paramagnetyczny. Przyspieszenie relaksacji Fe-S przez żelazo hemu b_L przedstawiono czarnymi, przerywanymi strzałkami.

Mając znaną strukturę krystalograficzną cytochromu bc_1 [15] uzyskaną w obecności stigmateliny (inhibitora wymuszającego pozycję domeny ISP przy Q_o) możliwe było oszacowanie szybkości relaksacji spinowo-sieciowej żelaza hemu b_L na wartość ok. 4×10^6 s^{-1} w temperaturze 19,5 K. Dzięki temu możliwe było przeprowadzenie symulacji krzywej zaniku echa spinowego przy założeniu, że domena Fe-S znajduje całkowicie w pozycji, która umożliwia transfer elektronu

z Fe- S na podjednostkę cytochromu c_1 (tzw. pozycja c_1). Porównanie wyników eksperymentalnych z wynikami symulacji tej krzywej wskazały na to, że o ile możliwe są warunki w których niemal cała populacja domen ISP znajduje się w bezpośrednim sąsiedztwie miejsca Q_o (pozycja Q_o) o tyle **nie zaobserwowano warunków, w których cała populacja znajduje się pozycji c_1**. Interpretacja tych wyników pozwala na stwierdzenie, iż w przypadku izolowanego białka pozycja domeny ISP w populacji nie jest jednoznacznie określona. Zamiast tego prawdopodobnie obserwuje się dystrybucje położeń domeny ze zmianą średniej gęstości położeń w zależności od stanu enzymu, mutacji, obecności inhibitora tego kompleksu lub substratu dla miejsca Q_o/Q_i.



Rys. 2. Efekt redukcji askorbinianem i ditionianem na relaksację fazową klastra Fe-S. Z lewej przedstawiono zanik amplitudy echa spinowego w funkcji czasu po zadziałaniu impulsów pi/2 – pi. Po prawej przedstawiono temperaturową zależność szybkości zaniku echa spinowego Fe-S w cytochromie bc_1 z dodatkiem stigmateliny (całość domeny ISP w pozycji najbliższej hemu b_L).

Opracowanie przedstawionej metody określania średniego położenia domeny w cytochromie bc_1 miało znaczący wpływ na rozwój badań zmierzających do zrozumienia związku między ruchem domeny Fe-S, generacją ROS i sprawnością energetyczną pompowania protonów, w czym kluczowy jest mechanizm wydajnej bifurkacji elektronów w trakcie reakcji utleniania QH_2 w miejscu Q_o enzymu. Metoda ta stała się powszechną, używaną w Zakładzie Biofizyki Molekularnej. Dzięki niej przebadano szereg mutacji wpływających na zmianę położenia domeny ISP oraz udało się skorelować położenie domeny z wydajnością generacji wolnych rodników [41–43]. Stwierdzono, że mutacje powodujące zwiększenie gęstości domeny w pobliżu miejsca Q_o (mutacje z insercją 1Ala oraz 2Ala w rejonie zawiasowym białka ISP [44]) zmniejszają ilość generowanych przez enzym reaktywnych form tlenu [41,45]. W skrajnym przypadku (insercja 2Ala) enzym całkowicie przestaje generować ROS. Szczegółowa analiza wpływu białka ISP na wielkość generowanego rodnika ponadtlenkowego pozwoliła na konstrukcje modelu jego powstawania, a wyniki tych badań oraz mechanizm generowania ROS przez cytochrom bc_1 zostały opisane w jednej z moich prac[1] [41,46].

1 Wspomniana publikacja jest pracą pierwszoautorską habilitanta i zawiera szczegółową analizę wpływu mutacji zwiększających gęstość domeny ISP w pobliżu miejsca Q_o i ich wpływ na produkcję anionorodnika ponadtlenkowego, a także porównanie dwóch możliwych scenariuszy reakcji prowadzących do jego powstania wraz ze wskazaniem na bardziej prawdopodobny mechanizm nazwany przez habilitanta i przyjęty w środowisku naukowym mechanizmem *semireverse*. Praca ta nie została dołączona do cyklu prac stanowiących osiągnięcie habilitacyjne ze względu na fakt, iż w pewnej części wyniki tam opublikowane były częścią pracy doktorskiej jednego ze współautorów.

W kolejnych krokach uzyskana metodologia przyczyniła się do sformułowania bardziej ogólnej zasady produkcji wolnych rodników przez kompleks cytochromu bc_1 oraz określenia przyczyn niektórych chorób metabolicznych związanych z pojawieniem się mutacji mitochondrialnych na genie kodującym podjednostkę cytochromu *b*. **Ustalono także związek pomiędzy przesunięciem domeny ISP, a powstawaniem metatabilnego stanu semichinonu sprzężonego spin-wymiennie ze zredukowanym klasterem Fe-S** (o czym będzie mowa w dalszej części autoreferatu). Dane te zostały opisane w pracy, która w dniu sporządzenia autoreferatu znajduje się w recenzjach.

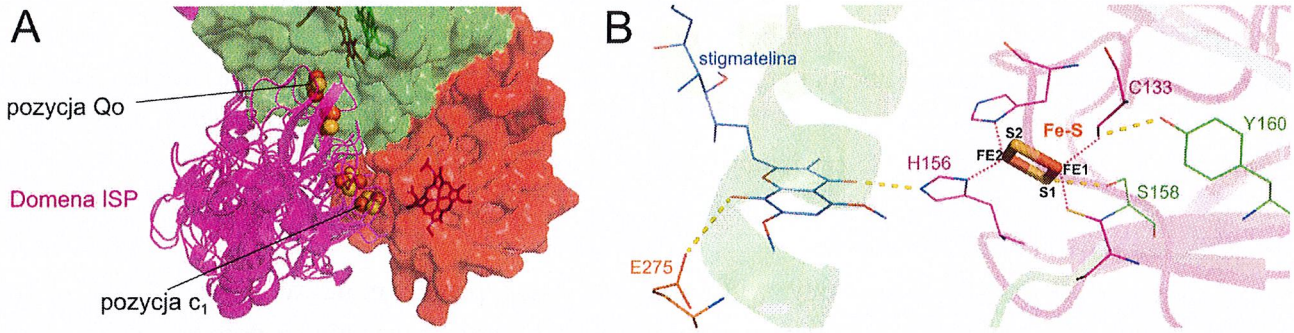
Wszystkie eksperymenty zostały wykonane osobiście przeze mnie w Zakładzie Biofizyki Molekularnej UJ. Analiza oddziaływań dipolowych została przeprowadzona z pomocą pozostałych współautorów pracy.

Analiza mechanizmów relaksacji spinowo-sieciowej klastra Rieskego oraz ich związek ze zmianami strukturalnymi intra- i intermolekularnymi.

(Zwięzły opis prac przedstawionych w publikacji: Effect of H bond removal and changes in the position of the iron-sulphur head domain on the spin-lattice relaxation properties of the $[2Fe\text{-}2S]^{2+}$ Rieske cluster in cytochrome bc_1. *Physical Chemistry and Chemical Physics*, (2015), 17, 25297-25308)

Jednym z podstawowych zagadnień związanych ze strukturą elektronową i oddziaływaniem klastra Fe-S z otoczeniem (siecią) jest pytanie o podstawowe mechanizmy jego relaksacji paramagnetycznej oraz to, czy otrzymane parametry poszczególnych mechanizmów relaksacji mają związek ze zmianami struktury i dynamiki w obrębie domeny wiążącej klaster. Aby móc odpowiedzieć na to pytanie przeprowadzono pomiary temperaturowej zależności szybkości relaksacji spinowo-sieciowej w całym, dostępnym dla spektroskopii EPR metali, zakresie dla formy natywnej cytochromu bc_1 oraz mutein ze zmienioną dystrybucją domeny ISP, bez i w obecności inhibitorów.

Wśród analizowanych form znajdowały się muteiny podjednostki ISP ze zmienionymi resztami S158 oraz Y160 odpowiednio na alaninę i tryptofan. Na podstawie struktur krystalograficznych uzyskanych dla cytochromu bc_1 pochodzącego z bakterii purpurowych stwierdzono, że grupa hydroksylowa łańcucha bocznego seryny 158 tworzy wiązanie wodorowe z jonem żelaza FE1 klastra Fe-S podczas gdy grupa hydroksylowa łańcucha bocznego tyrozyny 160 tworzy wiązanie wodorowe z cyteiną 133, która koordynuje jon żelaza FE1 klastra FeS (rys. 3) [15,47,48]. Zmiany wywołane mutacjami tych miejsc określono w pracy jako zmiany lokalnego otoczenia klastra (zmiany intramolekularne). Oprócz tego przeanalizowano efekt mutacji związanych ze zmianą globalnego położenia domeny ISP na skutek wprowadzenia dodatkowych aminokwasów w rejonie zawiasowym domeny. W tym przypadku zmiany wywołane tymi mutacjami określono jako zamiany globalnej konformacji domeny ISP (zmiany oddziaływań intermolekularnych) (rys. 3). Dodatkowym elementem pracy była analiza szybkości relaksacji badanych cytochromów bc_1 w obecności kilku różnych inhibitorów mających wpływ zarówno na globalną konformację domeny ISP, jak i na zmianę lokalnego otoczenia klastra związanego z tworzeniem się wiązań wodorowych pomiędzy inhibitorem w miejscu Q_o oraz histydyną 156 koordynującą klaster Fe-S.



Rys. 3. Fragmenty struktur krystalograficznych cytochromu bc_1 wraz z zaznaczonymi elementami, które podlegały zmianie na skutek mutacji i/lub obecności inhibitorów. A) Zaznaczone 4 pozycje klastra Fe-S, które są dostępne na skutek globalnych zmian konformacyjnych domeny ISP. B) Bezpośrednie otoczenie klastra Fe-S w cytochromie bc_1 wraz zaznaczonymi resztami aminokwasowymi tworzącymi bezpośrednie wiązania z klastrem.

Pomiary szybkości relaksacji klastra Fe-S wyznaczono w oparciu o dwie metody. W zakresie niskich temperatur od 5 do maksymalnie 30 K przeprowadzono pomiary odzysku amplitudy echa spinowego w czasie po impulsie odwracającym (ang. *inversion-recovery*). W wyższych temperaturach, tj w zakresie od ok. 70 do maksymalnie 120 K czasy relaksacji wyznaczono pośrednio metodą symulacji widm fali ciągłej klastra Fe-S poszerzonych lorentzowsko w wyniku relaksacji spinowo-sieciowej Fe-S. W temperaturach pomiędzy 30 a ok 70 K eksperymentalne oszacowanie było niemożliwe.

W pierwszym przypadku parametr szybkości relaksacji ($1/T_1$) wyznaczono na podstawie dopasowania funkcji rozciągniętej eksponenty [49] do krzywych *inversion-recovery* otrzymując wartości czasu relaksacji bezpośrednio z przebiegu krzywej. W przypadku wysokotemperaturowych danych konieczne było opracowanie odpowiedniego modelu umożliwiającego symulacje widm tak, aby uzyskać wartość poszerzenia lorenztowskiego. Konstrukcja modelu umożliwiającego przeprowadzenie symulacji opierała się na wykorzystaniu teorii statystycznej natury dystrybucji struktur metalicznych centr paramagnetycznych odzwierciedlających się w anizotropii naprężeń wokół danego centrum, co uwidocznione było jako anizotropia dystrybucji współczynnika *g* (ang. *g-strain*) [50]. **Stwierdzono, iż samo wprowadzenie anizotropii *g-strain* było niewystarczające aby wiarygodnie odtworzyć kształt widm Fe-S. W związku z tym wprowadzono do modelu anizotropię poszerzenia lorentzowskiego, co jest konsekwencją istnienia znacznej anizotropii relaksacji spinowo-sieciowej Fe-S.** Wymagało to przeprowadzenia symulacji z uwzględnieniem trzech wartości poszerzenia homogenicznego, współosiowego z kierunkami wyznaczonym przez osie główne tensora **g** klastra. Dzięki temu kształty widm eksperymentalnych zostały doskonale odtworzone przez symulację i możliwe stało się wyznaczenie wartości szybkości relaksacji z widm fali ciągłej.

Zależności szybkości relaksacji od temperatury wskazały na istnienie trzech podstawowych mechanizmów relaksacji, co było już proponowane we wcześniejszych pracach jako mechanizmy relaksacji dla białek żelazowo-siarkowych [51–53]. Są to: a) proces prosty, możliwy do obserwacji w temperaturach do maksymalnie 10 K; b) mechanizm Ramana, dominujący w zakresie temperatur

od ok 10 do ok 60 K oraz iii) proces Orbacha, dominujący w zakresie od ok. 60 K do granicy obserwowanego zjawiska EPR dla Fe-S przy ok. 120 K.

Parametry związane z opisem mechanizmu Orbacha wykazały, że **energia sprzężenia antyferromagnetycznego w białku Rieskego cytochromu bc_1 jest w jednostkach temperatury rzędu 450 K i jest nieznacznie wyższa dla mutein, które mają usunięte wiązanie wodorowe pomiędzy seryną 158 lub tyrozyną 160 a klastrem Fe-S.** Z kolei nie zauważono, aby globalne zmiany położenia domeny ISP znacząco wpływały na siłę oddziaływania wymiennego. Niewielki wzrost energii sprzężenia antyferromagnetycznego związany jest prawdopodobnie ze zmianą kątów pomiędzy atomami żelaza i siarki w klastrze Fe-S.

Bardzo ciekawe wyniki otrzymano z analizy procesu Ramana. Praktycznie wszystkie analizowane formy cytochromu bc_1 cechuje jednakowa wartość temperatury Debye'a, wynoszącą średnio 105 K. Stwierdzono znaczne różnice w wydajności tego procesu dla poszczególnych różnych form cytochromów bc_1. Zgodnie z teorią relaksacji paramagnetycznej wydajność tego mechanizmu (wyrażonego parametrem C_{Ram}) zależy od wielkości oddziaływania spin-orbita, które na widmie EPR jest odzwierciedlone jest poprzez jego anizotropię. Drugim czynnikiem mającym wpływ na ten proces jest sztywność struktury, w której znajduje się dane centrum paramagnetyczne. Przyjmuje się, że im większa sztywność struktury tym mniej wydajny jest proces Ramana i mniejsza wartość parametru C_{Ram} [54]. Jednakże trudno jest uzyskać spójne wyniki eksperymentalne mogące potwierdzić to założenie. Jest to spowodowane tym, że najczęściej porównuje się centra paramagnetyczne pochodzące z różnych białek, a sam ten fakt wprowadza już bardzo dużą zmienność. W przypadku niniejszej pracy nie występowała zmienność wynikająca ze zmiany jednego białka na inne.

Zaobserwowano, że wraz ze wzrostem anizotropii widm EPR wydajność procesu Ramana rośnie w przybliżeniu z kwadratem parametru opisującego anizotropię widmową (A) wyrażoną poniższym wzorem:

$$A=\sqrt{\sum_{i}^{n}\left[(g_e-g_i)^2\cdot f(g_i)\cdot\Delta g\right]}\ ,$$

gdzie: g_e – wartość g swobodnego elektronu, g_i – wartość g w i-tym punkcie widma, $f(g_i)$ – amplituda widma absorpcji w punkcie g_i, Δg – rozdzielczość cyfrowa widma EPR.

Taki wynik jest zgodny z teoretycznym przewidywaniem dotyczącym wydajności procesu Ramana. Jednakże dla natywnego białka oraz dla mutein S158A i Y160W zauważono dodatkowy efekt związany ze zmianą parametru C_{Ram}. **Dla niektórych enzymów ze zmienionym położeniem globalnym domeny ISP zaobserwowano zmianę wydajności bez jednoczesnej zmiany parametrów anizotropii.** Jest to szczególnie wyraźne w przypadku natywnego enzymu, w którym obecność inhibitorów myksotiazolu i/lub antymycyny zmienia położenie domeny. W tym przypadku im mniejsza jest gęstość domeny ISP w położeniu bliskim miejsca Q_o tym większa jest wartość parametru C_{Ram}. **Z kolei wykryto, że w niektórych centrach Fe-S wydajność procesu Ramana maleje wraz ze wzrostem anizotropii dla cytochromów bc_1, w których domena została przesunięta w stronę miejsca Q_o, czy to na skutek insercji jednej lub dwóch alanin w miejscu zawiasowym domeny ISP, czy też na skutek oddziaływania z inhibitorem miejsca Q_o takim jak tridecyl-stigmatelina, atowakwon lub famoksadon**. Zmiany te wytłumaczyć można zakładając modyfikacje sztywności struktury centrum paramagnetycznego, co pociąga za sobą

zmiany w modach wibracyjnych wpływających na relaksację paramagnetyczną. W konsekwencji można zaobserwować, iż przesunięcie domeny w stronę miejsca Q_o powoduje wzrost sztywności centrum Fe-S. Dodatkowe utworzenie wiązania wodorowego pomiędzy inhibitorem miejsca Q_o a histydyną 156, która koordynuje klaster Fe-S, powoduje dalsze zwiększenie sztywności centrum. **Zatem korzystając jedynie z pomiarów relaksacji spinowo-sieciowej można oszacować położenie domeny ISP względem Q_o, a pomiar ten nie jest uzależniony od oddziaływania dipolowego pomiędzy Fe-S, a hemem b_L. Dzięki temu jest możliwe określenie zmian w globalnej dystrybucji domeny niezależnie od stanu redoks pozostałych kofaktorów obecnych w strukturze cytochromu bc_1.**

Zdecydowana większość eksperymentów oraz analiz została przygotowana przeze mnie w Zakładzie Biofizyki Molekularnej UJ.

Wykrycie formy przejściowej semichinonu sprzężonego spin-wymiennie z klastrem żelazowo-siarkowym w miejscu katalitycznym Q_o cytochromu bc_1.

(Zwięzły opis prac przedstawionych w publikacji: Triplet state of the semiquinone-Rieske cluster as an intermediate of electronic bifurcation catalyzed by cytochrome bc_1. (2013), *Biochemistry*, 52, 6388-6395.)

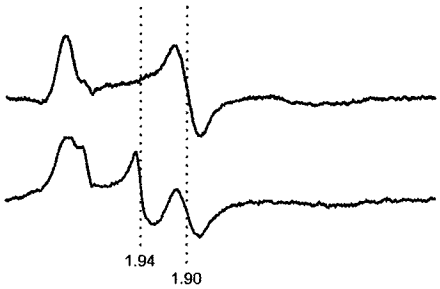
Jednym z najbardziej intrygujących zagadnień związanych z katalizą utleniania QH_2 w miejscu Q_o cytochromów z rodziny *bc* jest mechanizm bifurkacji elektronów na dwie niezależne gałęzie kofaktorów: łańcuch wysokopotencjałowy, złożony z klastra Fe-S i hemu c_1 oraz łańcuch niskopotencjałowy, złożony z dwóch hemów *b* (hemu b_L i b_H). Po sformułowaniu ogólnych założeń mechanizmu cyklu Q oraz na podstawie szeregu wczesnych prac biochemicznych stało się jasne, że obserwowany przez badaczy sygnał semichinonu (SQ) w cytochromie bc_1 pochodzi z miejsca katalitycznego Q_i [55,56]. Pojawiło się zatem pytanie o warunki jakie muszą być spełnione aby zarejestrować sygnał EPR semichinonu, ale pochodzącego z miejsca katalitycznego Q_o. Pytanie to było o tyle istotne, iż wykrycie tego sygnału pozwoliłoby rzucić światło na mechanizm dwuelektronowego utlenienia QH_2, a w szczególności pozwoliłoby na odpowiedzenie na pytanie dlaczego tylko jeden, a nie dwa elektrony z QH_2 ulega przeniesieniu zgodnie kierunkiem jaki wynika z potencjałów równowagowych dla Fe-S i hemów *b*. Z tymi pytaniami związane jest też koleje ważne zagadnienie dotyczące tego, czy rzeczywiście można mówić o powstawaniu semichinonu w miejscu Q_o (zakładając tzw. mechanizm sekwencyjny [57]), czy też może dwuelektronowe utlenienie QH_2 zachodzi równocześnie (zgodnie z mechanizmem jednoczesnym [58]). Początkowe próby wykrycia semichinonu w miejscu Q_o w eksperymentach z równowagowym miareczkowaniem redoks bakteryjnych chromatoforów nie przyniosły spodziewanych rezultatów i nie udało się uzyskać sygnału SQ pochodzacego z miejsca Q_o [22]. Z drugiej strony zaobserwowano, że cytochrom bc_1, w warunkach kiedy miejsce Q_i jest zablokowane przez antymycynę, produkuje znaczne ilości rodnika ponadtlenkowego [22]. Tłumaczono to obecnością niestabilnego, a zatem wysoce reaktywnego semichiononu w miejscu Q_o, dla którego potencjał równowagowy pary SQ/Q jest na tyle niski, że jest w stanie oddać jeden z elektronów na tlen cząsteczkowy [59]. Trwające przez kolejne lata próby wykrycia semichinonu w miejscu Q_o nie przynosiły spodziewanych rezultatów [22,23,25,60], a niektóre doniesienia,

ukazujące się w latach 2008-2013 (w naszej ocenie) nie mogły stanowić bezsprzecznego dowodu na istnienie SQ w miejscu katalitycznym Q_o [61–63].

W jednym z przeprowadzonych przeze mnie eksperymentów, celem była identyfikacja rodnika semichinonowego w miejscu Q_i enzymu, ale wygenerowanego nie poprzez równowagowe miareczkowanie redoks, lecz w trakcie reakcji enzymatycznej. W trakcie realizacji zaobserwowano, że w izolowanym cytochromie bc_1 z mutacją H217L, przy obecności substratów (syntetyczny analog QH_2 oraz cytochrom *c*), w temperaturze ok. 200 K i dużych wartościach mocy mikrofalowej powstaje sygnał EPR typowy dla rodnika semichinonowego, lecz o dużej szerokości linii. Dodatkowo sygnał ten był zarejestrowany także w obecności antymycyny (inihibitor Q_i). Ponadto eksperymenty kontrolne wykazały, że sygnał ten znika po dodaniu myskotiazolu (inhibitora miejsca Q_o). Co więcej, zaobserwowano anomalne własności paramagnetyczne tego sygnału, które nie odpowiadają typowym sygnałom rodników organicznych w warunkach, kiedy znajdują się one w ośrodkach magnetycznie rozcieńczonych, np. w zamrożonych roztworach wodnych. Pierwszą taką obserwacją było odstępstwo od prawa Curie, które mówi o tym, że dla centr paramagnetycznych nieoddziałujących ze sobą, wraz ze spadkiem temperatury obserwuje się wzrost amplitudy ich sygnałów EPR na skutek zwiększenia stosunku obsadzeń Boltzmana dla stanów spinowych – ½ i + ½. **W przypadku sygnału semichinonu, o którym jest mowa, w miarę obniżania się temperatury, obserwuje się systematyczny spadek amplitudy sygnału praktycznie aż do jego całkowitego zaniku.** Co ciekawe, spadek amplitudy nie pociąga za sobą zmian szerokości linii rezonansowej. Efekt ten jest bardzo trudny do wyjaśnienia i obecnie przyjmuje się jako obowiązującą teorie zaproponowaną przez Leigh'a, który bazuje na bardzo silnym oddziaływaniu dipolowym pomiędzy szybko- a wolno relaksującymi centrami paramagnetycznymi w takim stopniu, że jedynie te rodniki, dla których kąt pomiędzy wektorem zewnętrznego pola magnetycznego $\mathbf{B_0}$, a wektorem łączącym rodnik i metal jest bliski wartości kąta magicznego (ok. 54 stopnie) [64]. W przypadku SQ zarejestrowanego w przeprowadzonym przez nas eksperymencie takie własności paramagnetyczne można wytłumaczyć bliskim sąsiedztwem szybko relaksującego centrum metalicznego. Zakładając, że rodnik ten powstaje w miejscu Q_o oczywistym kandydatem na partnera do silnego oddziaływania z SQ jest jon żelaza utlenionego hemu b_L i/lub zredukowany klaster Fe-S.

Najbardziej zaskakującym rezultatem uzyskanym w trakcie przeprowadzonych eksperymentów był kształt widma EPR w zakresie pola, przy którym rejestruje się sygnał klastra Fe-S zarejestrowany w 20 K dla próbek, w których jednocześnie zarejestrowano anomalny sygnał SQ w temperaturze 200 K. **Na widmach tych, oprócz linii typowych dla Fe-S, zaobserwowano dodatkowe przejścia EPR, których charakter i kształt przypominał sygnały jakie otrzymuje się dla zredukowanych ferredoksyn** [65]. **Charakterystycznym przejściem dla tego dodatkowego sygnału była jego środkowa linia, której punkt przejścia przez zero (pierwsza pochodna absorpcji) przypada na wartość g = 1.94** (rysunek 4). **Te dodatkowe przejścia w cytochromie bc_1 nie były wcześniej opisywane.** W przypadku redukcji chemicznej próbek cytochromu bc_1 przy użyciu askorbinianu sodu, bądz ditionianu sodu dodatkowe przejścia EPR nie pojawiają się i rejestruje się jedynie sygnał Fe-S. Oznacza to, że przejście w g = 1.94 nie może pochodzić od ewentualnych zanieczyszczeń próbek innymi kompleksami zawierającymi klastry żelazowo-siarkowe [66,67]. Co więcej, nie udało się wykryć tego dodatkowego sygnału w próbkach

białka, w których przeprowadzono równowagowe miareczkowanie redoks cytochromu bc_1. **Natomiast najważniejszym eksperymentem kontrolnym było stwierdzenie, że zarówno sygnał semichinonu, jak i dodatkowego sygnału pojawiającego się na tle białka żelazowo-siarkowego w g = 1.94 są wrażliwe na obecność inhibitorów Q_o.** Spośród przetestowanych inhibitorów (myksotiazol, tridecylstigmatelina, famoksadon atowakwon, azoksystrobina, krezoksym metylu), wszystkie powodowały całkowity zanik tych sygnałów. Wynik taki świadczy o tym, iż zarówno sygnał semichinonu, jak i dodatkowy sygnału ferredoksyno-podobnego na widmie klastra Fe-S muszą pochodzić z miejsca katalitycznego Q_o. Dodatkowym testem był pomiar tych sygnałów w przypadku muteiny G158W [59,68] na cytochromie *b*, który ze względu na zawadę steryczną wewnątrz kieszeni Q_o nie może wiązać żadnych inhibitorów ani substratów. W przypadku tej muteiny także nie obserwuje się wspominanych sygnałów EPR, co ostatecznie potwierdziło, że oba te sygnały są związane z kieszenią miejsca katalitycznego w rejonie 158 reszty aminokwasowej cytochromu *b*.



Rys. 4. Widma EPR w paśmie X zarejestrowane w 20 K w zakresie pola magnetycznego w którym rejestruje się Fe-S. Górne - widmo zredukowanego klastra Fe-S w warunkach równowagi. Dolne – widmo zarejestrowane w próbce zamrożonej w trakcie katalizy. Przerywaną linią zaznaczono przejście g_y dla Fe-S w punkcie g = 1.90 oraz jedno z przejść dla sygnału SQ-Fe-S przy g = 1.94.

Ważnym krokiem w określeniu natury obserwowanych sygnałów była analiza kształtu widm EPR uzyskanych w pasmie X i Q (odpowiednio 9,46 oraz 33,5 GHz). Ich porównanie wykazało znaczące zmiany w kształcie widm w zależności od pasma. **Środkowa linia dodatkowego sygnału EPR nałożonego z sygnałem Fe-S w paśmie X wypada przy g = 1.94, podczas gdy w pasmie Q ulega przesunięciu do wartości g = 1.96 czemu towarzyszy poszerzenie linii EPR.**

Zmiana położeń rezonansowych linii EPR przy zmianie częstotliwości świadczy o tym, iż dane przejście musi być wynikiem oddziaływania pomiędzy co najmniej dwoma centrami paramagnetycznymi [69]. Prawidłowe odtworzenie kształtu tych widm w symulacjach wymagało wprowadzenia członu oddziaływania wymiennego do hamiltonianu spinowego przy założeniu, że jednym z centrum jest SQ w miejscu Q_o natomiast drugim jest zredukowany Fe-S. **Dzięki przeprowadzonym symulacjom udało się oszacować bezwzględną wartość oddziaływania wymiennego |J|, która wynosi ok. 3,5 GHz.** Jednakże nie było możliwe ustalenie znaku sprzężenia J, a co za tym idzie rozróżnienia pomiędzy oddziaływaniem ferro- a antyferromagnetycznym. Rozróżnienie tych dwóch oddziaływań wymaga przeprowadzenia pomiarów w temperaturach bliskich zera bezwzględnego i w związku z tym zagadnienie, ze względów technicznych, wciąż pozostaje otwarte. **Wnioskiem płynącym z przeprowadzonych analiz symulacyjnych jest propozycja, iż semichinon obecny w miejscu Q_o cytochromu bc_1 występuje jako układ**

sprzężony poprzez oddziaływanie spin-wymienne z klastrem Fe-S (w dalszej części w stosunku do tej formy stosowany będzie skrót SQ-Fe-S).

Jak już wspomniano stan SQ-Fe-S powstaje w stężeniu wystarczającym do jego zarejestrowania w warunkach, kiedy cytochrom bc_1 jest inhibowany antymycyną i jednocześnie istnieje w mieszaninie reakcyjnej nierównowaga wynikająca z obecności zredukowanego syntetycznego substratu: decylubihydrochinonu oraz utlenionego cytochromu *c*. Aby przeanalizować zależność czasową amplitudy sygnału SQ-Fe-S od czasu rozpoczęcia reakcji przeprowadzono serie pomiarów freeze-quench, w których po szybkim zmieszaniu substratów z cytochromem bc_1 następowało zamrożenie próbki w wybranych punktach czasowych. W wyniku tych eksperymentów stwierdzono, że w czasie postępu reakcji amplituda sygnału SQ-Fe-S narasta osiągając maksimum w czasie rzędu kilkuset milisekund do kilku sekund po zmieszaniu i przypada na punkt czasowy, w którym połowa populacji klastrów Fe-S jest w stanie zredukowanym. W miarę dalszego postępu reakcji sygnał ten ulega zmniejszeniu, aż do całkowitego zaniku w momencie, gdy w mieszaninie reakcyjnej zostanie osiągnięta równowaga pomiędzy substratami, a produktami. We wszystkich zarejestrowanych do tej pory próbkach, w których wykryto sygnał SQ-Fe-S, hem b_H pozostaje w znacznym stopniu zredukowany, natomiast hem b_L pozostaje w stanie całkowicie utlenionym. Taki wynik jest interesujący, gdyż powszechnie przyjmuje się, iż semichinon w miejscu Q_o jest teoretycznie możliwy do wykrycia jedynie w sytuacji, gdy hem b_L jest zredukowany, a co za tym idzie może przyjąć elektronu z SQ [70]. W związku z tym zaproponowano, iż mechanizmem prowadzącym do jego powstania jest jednoelektronowa redukcja Q do formy SQ przez uprzednio zredukowany hem b_L. Tak powstający SQ tworzy stan sprzężony spin-wymiennie z Fe-S. Analiza maksymalnej ilości powstającego stanu SQ-Fe-S w cytochromie bc_1 pozwoliła na oszacowanie stałej stabilności tego semichinonu na ok. $10^{-2,6}$ co jest wartością znacznie większą niż podawane w literaturze ($<< 10^{-7}$) [59].

Osobnym problemem, nad którym obecnie pracuję pozostaje wyjaśnienie natury anomalnego sygnału semichinonu, który rejestruje się temperaturach 200 K, a którego amplituda pozostaje skorelowana z sygnałem SQ-Fe-S. Najprawdopodobniej jest to niewielka frakcja SQ, dla którego z pewnych przyczyn wielkość wymiany spin-spin jest zmniejszona, do tego stopnia, iż jedynie obserwuje się efekty poszerzenia linii i zwiększenia jego relaksacji na skutek oddziaływania dipol-dipol z paramagnetycznym centrum Fe-S i/lub bądź żelazem hemu b_L. Rozwiązanie tego problemu stanowi obecnie przedmiot intensywnych badań, a część uzyskanych wyników stanowi element rozprawy doktorskiej, w której pełniłem rolę promotora pomocniczego [2].

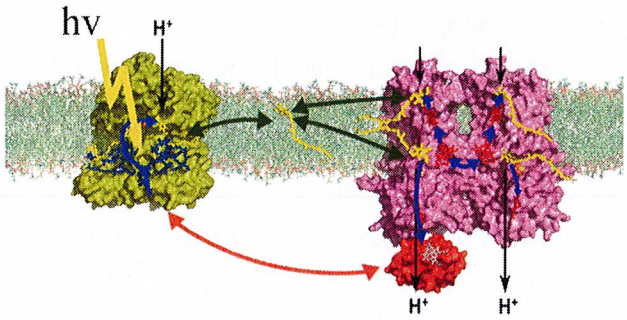
Większość eksperymentów oraz analiz została przygotowana przeze mnie w Zakładzie Biofizyki Molekularnej UJ.

Identyfikacja i charakterystyka redoks stanu SQ-Fe-S w cytochromie bc_1 w fotosyntetycznie aktywnych chromatoforach uzyskanych z bakterii *Rhodobacter capsulatus*.

2 Praca doktorska zatytułowana „Semichinon sprzężony z klastrem żelazowo-siarkowym jako nowy element w mechanizmie regulacji białek z rodziny cytochromów *bc*", (2018), Łukasz Bujnowicz, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ w Krakowie.

(Zwięzły opis prac przedstawionych w publikacji: Generation of semiquinone-[2Fe-2S]$^{+}$ spin-coupled center at the Q_o site of cytochrome bc_1 in redox-poised, illuminated photosynthetic membrane membranes from *Rhodobacter capsulatus*. (2018), *Biochimica at Biophysica Acta – Bioenergetics*, 1859, 145-153.)

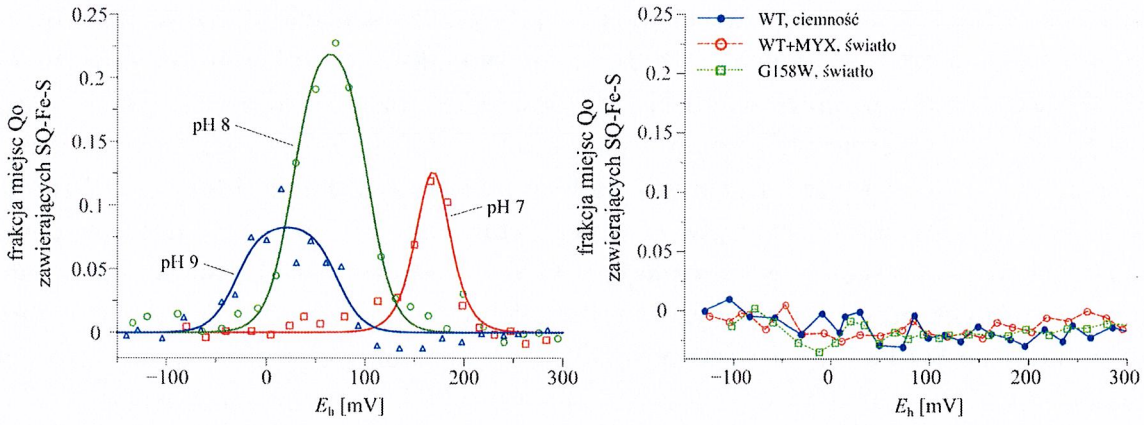
Wykrycie oraz identyfikacja stanu SQ-Fe-S w izolowanym kompleksie cytochromu bc_1 podczas katalizy z użyciem syntetycznego substratu zrodziło pytanie o to, czy w natywnym układzie bakteryjnym, w którym substratami są ubihydrorochinon-10 (UQH_2) oraz cytochrom c_2 / c_y również możliwe jest wykrycie tej formy w miejscu katalitycznym Q_o. Ze względu na całkowitą nierozpuszczalność UQH_2 w wodzie nie jest możliwe przeprowadzenie analogicznych eksperymentów na izolowanym cytochromie bc_1. W związku z powyższym przeprowadzono eksperymenty z wykorzystaniem naturalnych błon bakteryjnych (chromatoforów) zawierających kompletny aparat oddechowy i fotosyntetyczny, którego centralnym enzymem jest cytochrom bc_1 wraz z natywnymi substratami: UQH_2 i cytochromem c_2 / c_y (rys. 5). Podstawową zaletą w podejściu eksperymentalnym, w przypadku chromatoforów jest fakt, że przy zadanym zewnętrznym potencjale redoks możliwa jest aktywacja transferu elektronu przez łańcuchy kofaktorów cytochromu bc_1 wskutek aktywacji świetlnej centrum reakcji (RC). Aktywacja RC światłem prowadzi do przeniesienia elektronów z puli *c* do puli Q, przez co w układzie generowana jest nierównowaga termodynamiczna pomiędzy substratami dla cytochromu bc_1. Jednakże podstawową przeszkodą w możliwości identyfikacji sygnału SQ-Fe-S jest fakt, że w błonach chromatoforów występują inne białka zawierające klastry żelazowo-siarkowe (np. oksydoreduktaza NADH:ubichinon, oksydoreduktaza bursztynian:ubichinon) co może być czynnikiem znacznie utrudniającym identyfikacje przejść SQ-Fe-S ze względu na ewentualne nakładanie się widm EPR pochodzących z tychże innych centr żelazowo-siarkowych.



Rys. 5. Uproszczony schemat działania cyklicznego transferu elektronu w błonach chromatoforów. Układ składa się z centrum reakcji (zielony), cytochromu bc_1 (różowy), cytochromu c_2 (czerwony) oraz puli Q (żółty). Aktywacja światłem (żółta strzałka) powoduje transport elektronów z cytochromu c_2 do puli Q czemu towarzyszy przeniesienie protonów w poprzek błony.

Podstawą przeprowadzonych eksperymentów było miareczkowanie redoks chromatoforów z dodatkiem inhibitora miejsca Q_i (antymycyna) w warunkach nierównowagi termodynamicznej wywołanej ciągłym naświetlaniem. Eksperymenty polegały na ustaleniu zewnętrznego potencjału redoks (E_h) przy zadanej wartości pH w zawiesinie chromatoforów oraz aktywacja światłem. **W pewnych zakresach potencjału zewnętrznego, w próbkach naświetlanych światłem ciągłym obserwowano pojawienie się dodatkowego sygnału EPR, którego maksimum pierwszej**

pochodnej absorpcji przypada na g = 1.950. Sygnał ten w miarę obniżania się zewnętrznego potencjału najpierw narasta po czym w miarę dalszego obniżania zanika, a w jego miejsce pojawia się inny sygnał pochodzący z nisko-potencjałowych klastrów żelazowo-siarkowych. Maksymalna amplituda tego dodatkowego sygnału przypada na wartość E_h która zależy od pH roztworu. W pH 7, 8 i 9, maksimum przypada na odpowiednio wartość + 168, + 65 oraz + 21 mV (tabela 1). W przypadku, kiedy przeprowadzi się analogiczny eksperyment w warunkach równowagowych bez naświetlania, bądź w warunkach ciągłego naświetlania, ale przy jednoczesnym zablokowaniu miejsca Q_o przy użyciu specyficznego inhibitora (myksotiazol) lub na skutek mutacji (G158W), dodatkowy sygnał EPR nie pojawia się (rys. 6). Jest to dowód na to, że w tym przypadku, podobnie jak w układzie izolowanym również mamy do czynienia z sygnałem SQ-Fe-S, lecz semichinon jest formą rodnikową naturalnego ubisemichinonu. Sygnały EPR pojawiające się w niskim potencjale z maksimum linii przy g = 1.941 są niezależne od tego, czy próbki były naświetlane czy też nie, jak również nie zależały od tego czy cytochrom bc_1 posiadał funkcjonalne miejsce Q_o, czy nie. Sygnały te, pochodzą zatem od niskopotencjałowych centrów żelazowo-siarkowych pozostałych enzymów znajdujących się w błonie chromatoforów tj. oksydoreduktazy NADH:Q oraz oksydoreduktazy bursztnian:Q. Niemniej jednak, obecność tych sygnałów, mimo częściowego nakładania się z sygnałem SQ-Fe-S, nie wpływa na możliwość specyficznej analizy profilu Nernsta sygnału sprzężonego semichinonu z klastrem Fe-S na chromatoforach.



Rys. 6. Obsadzenie miejsc Q_o cytochromu bc_1 formą SQ-Fe-S na chromatoforach w zależności od potencjału zewnętrznego (E_h) w obecności antymycyny. Z lewej powstawanie SQ-Fe-S w natywnej formie cytochromu bc_1 w pH 7, 8 i 9 (odpowiednio czerwony, zielony i niebieski). Z prawej, eksperymenty kontrolne wykonane w ciemności (niebieski), oraz na świetle w warunkach niefunkcjonalnego miejsca Q_o z inhibitorem tego miejsca – myksotiazolem (czerwony) oraz w cytochromie bc_1 z mutacją dezaktywującą miejsce Q_o – G158W (zielony).

Dokładna analiza krzywych miareczkowania puli Q, hemów b_L, b_H oraz SQ-Fe-S pozwoliła na określenie szeregu interesujących parametrów redoks związanych z obecnością tego ostatniego w cytochromie bc_1. Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że w warunkach nierównowagowych pozorny potencjał puli Q zdefiniowanej jako para Q/QH_2 ulega przesunięciu w kierunku wartości o wyższym potencjale, podczas gdy hem b_H ulega rozszczepieniu na dwie populacje o wyższym i niższym potencjale. Wynik taki jest zgodny z oczekiwaniem, przy założeniu, że aktywacja RC powoduje transfer elektronów z puli *c* do puli Q. Z drugiej strony

aktywność utleniająca miejsca Q_o powoduje przeniesienie elektronu na hem b_H. W sytuacji gdy nie jest możliwy odpływ elektronów przez miejsce Q_i (w obecności antymycyny) zaobserwowano redukcje tego hemu w wyższych wartościach E_h niż w przypadku kiedy przeprowadza się miareczkowanie redoks w warunkach równowagowych.

W celu opisania własności redoks SQ-Fe-S, a w szczególności uzyskania informacji na temat potencjałów par redoks Q/SQ-Fe-S oraz SQ-Fe-S/QH_2 przyjęto założenie, iż w trakcie ciągłego naświetlania powstają warunki stacjonarne w układzie, przez co możliwe będzie użycie równań Nernsta do opisu potencjałów obu tych par. W poniższej tabeli zebrano najważniejsze parametry redoks uzyskane dla centrum SQ-Fe-S w chromatoforach zawierających natywny cytochrom bc_1.

pH	Maksymalna frakcja miejsc Q_o obsadzonych przez stan SQ-Fe-S [%]	E_h przy którym występuje maksymalny sygnał SQ-Fe-S [mV]	E_m (Q/SQ-Fe-S) [mV]	E_m (SQ-Fe-S/QH_2) [mV]
7	32	+ 168	+ 172	+ 164
8	24	+ 65	+ 102	+ 27
9	8,6	+ 21	+7 1	- 30

Tabela 1. Maksymalna wydajność oraz parametry redoks dla par związanych z powstawaniem formy SQ-Fe-S cytochromu bc_1 miareczkowanego w warunkach ciągłego naświetlania.

Na podstawie wyników otrzymanych w ramach tej pracy stwierdzono, iż maksymalny sygnał SQ-Fe-S obserwuje się w przypadku, kiedy frakcja wysokopotencjałowa części hemów b_H jest całkowicie zredukowana. **Z kolei w żadnym przypadku, w zakresie badanych E_h nie zaobserwowano zredukowanego hemu b_L.** Przypuszczalnie oznacza to, iż warunkiem powstania formy SQ-Fe-S w kompleksie cytochromu bc_1 jest stan, kiedy hem b_H jest zredukowany. **Natomiast niemożność transferu elektronu z hemu b_L na hem b_H jest czynnikiem, który stabilizuje formę SQ-Fe-S, co jest elementem zabezpieczającym cytochrom bc_1 przed nadmierną generacją rodnika ponadtlenkowego w sytuacji, kiedy odpływ elektronów z łańcucha niskopotencjałowego jest utrudniony.** Jest to kolejny wynik wskazujący, że w warunkach, w których powstaje SQ-Fe-S hem b_L pozostaje w stanie utlenionym. Obecnie trwają prace mające na celu przetestowanie tej hipotezy. Ich rozwinięciem są badania przeprowadzone w ramach rozprawy doktorskiej, w której pełnię rolę promotora pomocniczego, a także pracy magisterskiej, wykonywanej pod moją opieką.

Zdecydowana większość pracy została zaprojektowana, przygotowana i wykonana przeze mnie w Zakładzie Biofizyki Molekularnej UJ.

Omówienie mechanizmu działania cytochromu bc_1 w kontekście fizjologicznym z uwzględnieniem ostatnich odkryć dotyczących funkcjonowania miejsca Q_o.

(Zwięzły opis prac przedstawionych w publikacjach przeglądowych: [1]. Electronic connection between the quinone and cytochrome *c* redox pools and its role in regulation of mitochondrial electron transport and redox signaling. *Physiological Reviews*, (2015), 95, 219-243. [2]. Distinct properties of semiquinone species detected at the ubiquinol oxidation Qo site of cytochrome bc_1 and their mechanistic implications. *Journal of the Royal Society Interface,* (2016), 13, 20160133.)

Cytochromy *bc* są odpowiedzialne za ok 30 % całkowitej konwersji energii w biosferze na użyteczną z punktu widzenia biologicznego formę siły protono-motorycznej [1]. Są to centralne enzymy zaangażowane w fotosyntezę, jak i w oddychanie tlenowe. Ten drugi proces jest szczególnie istotny z punktu widzenia funkcjonowania komórek eukariotycznych. Wszystkie mutacje mitochondrialne powodujące istotne zmiany w funkcjonowaniu enzymów bc_1, powodują bardzo poważne schorzenia metaboliczne prowadzące do upośledzenia funkcji życiowych, a nawet do śmierci. W ramach pracy przeglądowej, która ukazała się na łamach czasopisma *Physiological Reviews,* przedstawiono aktualny stan wiedzy dotyczący podstawowych własności, mechanizmu katalizy oraz fizjologicznego znaczenia tego enzymu w mitochondriach.

Po krótkim wprowadzeniu wyjaśniającym architekturę mitochondrialnych kompleksów oddechowych oraz znaczenia cytochromu bc_1 w generowaniu siły protono-motorycznej i produkcji reaktywnych form tlenu przedstawiono w pracy ogólne założenia teorii transferu elektronów przez łańcuchy kofaktorów, ze szczególnym uwzględnieniem znaczenia odległości pomiędzy donorem a akceptorem elektronu. Następnie skupiono się na opisie podstawowych własności ubichinonów stanowiących błonową pulę przenośników elektronów oraz ich własności redoks. Zwrócono uwagę na fakt, że stała stabilności semichinonów poza miejscami katalitycznymi jest bardzo niska i nie obserwuje się sygnałów związanych z ich ewentualną obecnością w błonie. Jednocześnie położono nacisk na opis antyoksydacyjnych własności naturalnych oraz syntetycznych ubichinonów.

W dalszej części przedstawiono opis własności puli cytochromów *c*, w którym zwrócono uwagę na możliwość wymiany elektronów bezpośrednio pomiędzy cytochromami *c* zwany w języku angielskim procesem *electron self-exchange*. Jest to w dalszym ciągu proces, który nie został dokładnie przebadany w kontekście znaczenia fizjologicznego w mitochondriach, a którego istotna rola ze względu na duże stężenie cytochromu *c* w przestrzeni międzybłonowej, jest postulowana jako jedna z możliwych dróg przenoszenia elektronów z cytochromu bc_1 na oksydazę cytochromową.

W kolejnych etapach pracy omówiono główne założenia cyku katalitycznego cytochromu bc_1 wraz z opisem możliwych mechanizmów mogących prowadzić do powstawania reaktywnych form tlenu w miejscu Q_o tego enzymu. Zwrócono szczególną uwagę na opis procesów zachodzących w obrębie miejsc katalitycznych Q_o oraz Q_i, z uwzględnieniem wcześniejszych odkryć dotyczących możliwości tworzenia się stanu SQ-Fe-S oraz procesów związanych z transferem elektronu pomiędzy cytochromem c_1 a cytochromem *c* [45,71]. Ten ostatni aspekt katalizy cytochromu bc_1 był przedmiotem moich wcześniejszych badań, prowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej.

Kolejne rozdziały pracy stanowią opis oraz znaczenie fizjologiczne specyficznej architektury kofaktorów podjednostki cytochromu *b*. We wcześniejszych pracach wykonanych w Zakładzie Biofizyki Molekularnej, w których uczestniczyłem wykazano, że istnieje możliwość szybkiej wymiany elektronów pomiędzy hemami b_L znajdującymi się na sąsiednich monomerach cytochromu bc_1. Dzięki temu możliwe jest funkcjonalne połączenie dwóch miejsc Q_o po jednej stronie błony z dwoma miejscami katalitycznymi po drugiej stronie błony. Takie ułożenie kofaktorów w cytochromie bc_1 nazwane zostało przez autorów H-kształtnym (ang. H-shaped) [68,72,73]. W pracy przedstawiono ewentualne znaczenie fizjologiczne takiego ułożenia kofaktorów zapewniające funkcjonowanie tego enzymu w warunkach, w których doszłoby do

uszkodzenia jednego z miejsc Q_o lub Q_i niezależnie od tego czy uszkodzenie to dotyczy jednego, czy dwóch monomerów. Zwrócono również uwagę na fakt, że w przypadku składania się kompleksu w sposób asymetryczny, na skutek ekspresji różnych pul genu cytochromu *b*, w którym doszło do mutacji uszkadzających jeden z monomerów, prawdopodobieństwo pojawienia się całkowicie niefunkcjonalnego cytochromu bc_1 jest znacznie ograniczona.

Ostania część pracy poświęcona jest oddziaływaniom cytochromu bc_1 z niskocząsteczkowymi składnikami występującymi w obrębie błony mitochondrialnej, których obecność może istotnie wpływać na aktywność enzymatyczną. W szczególności skupiono się na efektywności tokoferolu oraz ich pochodnych (tokochinonów) na inhibicję cytochromu bc_1.

Druga z prac przeglądowych stanowi porównanie i omówienie dotychczasowych doniesień literaturowych dotyczących wykrycia formy SQ w miejscu katalitycznym Q_o cytochromu bc_1 w kontekście mechanizmu działania tego enzymu. W pracy przedstawiono pokrótce zarys wczesnych badań, które doprowadziły do sformułowania przez Petara Mitchela ogólnych założeń mechanizmu cyklu Q, po czym przedstawiono kolejno dotychczasowe wyniki prac zmierzających do wykrycia SQ. W zamieszczonych w pracy tabelach zestawiono podstawowe własności prezentowanych sygnałów oraz parametry eksperymentalne przy których zostały one zarejestrowane. Wyniki te zostały zestawione z koncepcją powstawania formy SQ-Fe-S, którą omówiono w poprzednich częściach autoreferatu. Przeprowadzono również dyskusję dotyczącą stabilności tej formy SQ oraz zaproponowano mechanizm, który umożliwia propagację funkcji falowych między rodnikiem semichinonu a zredukowanym klastrem Fe-S, prowadzącą do powstania formy spin-wymiennej między tymi dwoma centrami paramagnetycznymi. Zaproponowano istnienie trzech scenariuszy prowadzących do powstania SQ w miejscu Q_o. Pierwszy z nich dotyczy powstawania niestabilnego semichinonu, którego wykrycie było opisane przez innych autorów. Pozostałe dwa scenariusze uwzględniają istnienie sprzężonego centrum SQ-Fe-S odkrytego i opisanego w jednej z mojej wcześniejszych prac. Zakładają one powstawanie wiązania wodorowego pomiędzy anionową formą SQ, a uprotonowana histydyną 156 (numeracja *Rhodobacter capsulatus*), bądź pomiędzy neutralną formą SQ i zdeprotonowaną histydyny.

Najważniejsze osiągnięcia i wnioski naukowe płynące z cyklu publikacji stanowiących podstawę postępowania habilitacyjnego.

1. Wykazanie istnienia silnego oddziaływania dipolowego między klastrem Rieske'go (Fe-S), a utlenionym hemem b_L umożliwiające wyznaczanie średniego położenia domeny ISP względem odległości od miejsca katalitycznego Q_o, bez konieczności badania próbek cechujących się uporządkowaniem makroskopowym.

2. Przeprowadzenie szczegółowej charakterystyki mechanizmów relaksacji spinowo-sieciowej klastra Fe-S dla szeregu mutantów cytochromu bc_1, bez i w obecności znanych inhibitorów miejsc katalitycznych. Określenie wpływu położenia domeny ISP oraz obecności wiązań wodorowych wokół klastra na szybkość relaksacji, sztywność struktury oraz wielkość sprzężenia antyferromagnetycznego.

3. Odkrycie, że w trakcie cyklu katalitycznego powstają znaczne ilości metastabilnej formy semichinonu w miejscu Q_o, który oddziałuje spin-wymiennie ze zredukowanym klasterem na izolowanym cytochromie bc_1.

4. Identyfikacja i charakterystyka własności redoks formy semichinonu sprzężonego z klasterem Fe-S w układzie natywnych błon purpurowych bakterii fotosyntetyzujących znajdujących się w nierównowadze termodynamicznej.

5. Przedstawienie aktualnych danych literaturowych na temat doniesień związanych z próbami bezpośredniego wykrycia semichinonu w miejscu katalitycznym Q_o cytochromu bc_1 z uwzględnieniem ostatniego odkrycia formy metatabilnej semichinonu sprzężonego z klastrem Fe-S.

6. Przedstawienie aktualnego stanu wiedzy dotyczącego mechanizmu katalizy i roli cytochromu bc_1 w mitochondrich w aspekcie znaczenia fizjologicznego.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Zjawiskiem rezonansu magnetycznego zainteresowałem się jeszcze w czasie studiów. Wówczas w ramach pracy magisterskiej, którą przygotowywałem pod kierownictwem prof. dr hab. Stanisława Łukiewicza, zajmowałem się zagadnieniem wykorzystania melanin posiadających naturalny paramagnetyzm, jako endogennych środków kontrastujących, które można wykorzystać w obrazowaniu magnetycznego rezonansu jądrowego (MRJ). W ramach tej pracy badałem zależność relaksacji spinowo-sieciowej otoczenia melaniny w zależności od amplitudy sygnału EPR stabilnych rodników zawartych w strukturze polimeru melaniny. W wyniku tych badań wykazano, że istnieje korelacja pomiędzy paramagnetyzmem melanin, a szybkością relaksacji protonów wody wokół syntetycznych ziaren melanin. Prace te były rozszerzone na badania guzów melanotycznych rosnących w ciele gerbili. Guzy te na obrazach kontrastowanych ze względu na czas relaksacji T_1 były wyraźnie jaśniejsze niż otaczające je tkanki. Pomiary te zostały wykonane w Zakładzie Biofizyki Wydziału Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, we współpracy z Zakładem Tomografii Magnetyczno-Rezonansowej Instytutu Fizyki Jądrowej im. Henryka Niewodniczańskiego Polskiej Akademii Nauk w Krakowie pod kierownictwem prof. dr hab. Andrzeja Jasińskiego. Natomiast pomiary MRJ relaksacji spinowo-sieciowej protonów były wykonane w Zakładzie Radiospektroskopii Wydziału Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie.

Po obronie pracy magisterskiej podjąłem studia doktoranckie w ówczesnym Zakładzie Biofizyki Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii pod kierownictwem prof. dr hab. Wojciecha Froncisza, gdzie zająłem się badaniem oddziaływań pomiędzy cytochromem c_2, a bakteryjnym cytochromem bc_1 przy użyciu spektroskopii EPR. Projekt ten był związany z realizacją grantu KBN we współpracy z przebywającym wówczas na University of Pennsylvania dr Arturem Osyczką. W trakcie realizacji tych badań zapoznałem się z technikami znakowania spinowego białek oraz pomiarów z wykorzystaniem impulsowej spektroskopii EPR określanej w literaturze jako *saturation-recovery EPR* oraz z pomiarami fali ciągłej w

temperaturach kriogenicznych. Opracowałem także metodę stuprocentowej wydajności znakowania cytochromów *c* znacznikami spinowymi, dzięki czemu wszystkie eksperymenty były przeprowadzone na próbkach homogenicznych. Początkowo moje badania skupiały się na badaniu własności dynamicznych samego znacznika spinowego przyłączonego do cytochromu c_2. Następnie prace zostały rozszerzone na badania dynamiki znacznika spinowego przyłączonego do cytochromu c_2, który oddziałuje z izolowanym cytochromem bc_1. Dzięki użyciu techniki fali ciągłej oraz pomiarów relaksacji w fazie ciekłej metodą *saturation-recovery EPR* udało się określić szereg własności związanych z dynamiką oddziaływania między tymi dwoma białkami. W szczególności oszacowana stałą dysocjacji oraz stechiometrię wiązania się cytochromu c_2 z dimerem cytochromu bc_1. Ponadto określono, że w warunkach fizjologicznej siły jonowej roztworu nie obserwuje się stabilnych, długożyciowych kompleksów tych dwóch białek. Dane te stały się podstawą twierdzenia, iż czas życia ścisłego kompleksu cytochromów c_2 i bc_1 nie może być dłuższy niż ok 400 ns [45,74]. Porównując dane spektroskopowe oraz pomiary aktywności transferu elektronu katalizowane przez cytochrom bc_1 postawiono hipotezę, iż przeniesienie elektronu z hemu c_1 na hem *c* rozpuszczalnego cytochromu *c* wymaga zajścia wielokrotnych zderzeń pomiędzy cytochromem *c* a cytochromem c_1.

Dzięki wykorzystaniu pomiarów *saturation-recovery* w obecności dodatkowego szybko-relaksującego centrum (tlenu cząsteczkowego) ustalono orientację cząsteczki cytochromu c_2 względem cytochromu bc_1. Badania te zostały opublikowane w kilku pracach, w których byłem pierwszym autorem i głównym wykonawcą [45,75]. Zagadnienie to było przedmiotem zakończonego przewodu doktorskiego, w którym pełniłem rolę promotora pomocniczego[3] oraz jednej z publikacji [76].

W kolejnym projekcie byłem zaangażowany w badania poświęcone złamaniu symetrii homodimeru cytochromu bc_1 oraz analizie funkcjonalnej tego enzymu w przypadku, kiedy wyłączone zostaną poszczególne ścieżki transferu elektronu wzdłuż gałęzi kofaktorow nisko-potencjałowych. Moja rola w tym zadaniu polegała na przeprowadzeniu pomiarów spektroskopii EPR oraz optycznej, a także analizie danych kinetycznych uzyskanych metodą dwufalowej impulsowej spektrofotometrii (ang. *flash-induced kinetic measurements*). Wyniki tych badań doprowadziły do wykazania, iż transfer elektronu między monomerami może odbywać się poprzez transfer z jednego hemu b_L na drugi. Dzięki temu dowolna kombinacja kofaktorów hemowych cytochromu *b* łącząca miejsca Q_i i Q_o skutkuje aktywnością enzymatyczną redukcji cytochromu *c*. Jedną z prac, która ukazała się w ramach tych badań była opublikowana w prestiżowym czasopiśmie *Science* za co wraz z pozostałymi współautorami dostałem nagrodę zespołową Prorektora do Spraw Badań Naukowych UJ.

W ostatnich latach rozpocząłem projekt związany z badaniami nad tzw. alternatywnym kompleksem III, enzymem który nie jest spokrewniony strukturalnie ani genetycznie z cytochromem bc_1, natomiast pełni podobną funkcję co cytochrom bc_1 [77]. Na obecnym etapie trwają prace nad stworzeniem systemu genetycznego, które umożliwią spektroskopowe przypisanie poszczególnych przejść rezonansowych do odpowiednich niskospinowych hemów *c*.

3 „Dystrybucja przestrzenna białek opisana przez intermolekularne oddziaływania magnetyczne w układzie cytochrom c_2 – cytochrom bc_1". Rafał Pietras, praca doktorska, Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ, Kraków, 2015.

Istotnym elementem mojej pracy naukowej było zapoczątkowanie i rozwój autorskiego programu o nazwie Eleana, służącego do obróbki i analizy danych spektroskopowych, w szczególności ze spektroskopii EPR. Jest to program komputerowy rozwijany w oparciu o język programowania NI LabVIEW, został zapoczątkowany przeze mnie w roku 2006. Początkowo było to proste narzędzie potrzebne do przeprowadzenia analizy widm CW EPR, a obecnie program ten jest aktywnie rozwijany zarówno przeze mnie, jak i przez dra Rafała Pietrasa, który od dwóch lat jest zaangażowany w jego rozwój. W programie umieszczono algorytmy optymalizacji funkcji matematycznych do danych eksperymentalnych, a także dołożono moduły symulacji widm izotropowych oraz proszkowych EPR, używając algorytmu opisanego w jednej z moich prac, stanowiących osiągnięcie habilitacyjne. Program ten jest ogólnodostępny dla wszystkich zainteresowanych, a wersje binarne można znaleźć na stronie prywatnej pod adresem http://larida.pl/eleana. Eleana jest programem o szerokim zastosowaniu. Jest wykorzystywa zarówno podczas prowadzonych w Zakładzie Biofizyki Molekularnej zajęć dydaktycznych jak i w badaniach naukowych. Program jest wykorzystywany również w innych ośrodkach naukowych na świecie, wykorzystujących spektroskopię EPR.

W dotychczasowej karierze byłem głównym wykonawcą dwóch grantów międzynarodowych Wellcome Trust (pod kierownictwem prof. dra hab. Artura Osyczki) oraz wykonawcą dwóch grantów finansowanych przez KBN (Komitet Badań Naukowych) oraz NCN (Narodowe Centrum Nauki). Ponadto byłem kierownikiem dwóch grantów: Iuventus Plus finansowanego ze źródeł MNiSW oraz grantu uczelnianego finansowanego z dotacji KNOW (Krajowy, Naukowy Ośrodek Wiodący) dla Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii.

W roku 2017 wraz z prof. dr hab. Arturem Osyczką przygotowałem projekt grantowy poświęcony badaniu cyklicznego transferu elektronu w procesie fotosyntezy ze szczególnym naciskiem na zbadanie postulowanej roli cytochromu b_6f w tym procesie. Projekt ten został pozytywnie zaopiniowany i rekomendowany do finansowania w ramach programu TEAM finansowanego przez Fundację na Rzecz Nauki Polskiej. W projekcie tym jestem zastępcą kierownika, a oficjalne rozpoczęcie planowane jest na 1 grudnia 2018.

W trakcie trwania mojej kariery naukowej przyczyniłem się do wypromowania dwóch magistrantów. W chwili obecnej pod moją opieką pozostaje trzech kolejnych studentów ostatnich lat studiów, którzy przygotowują pracę magisterską. Ponadto byłem promotorem pomocniczym w zakończonym przewodzie doktorskim dra Rafała Pietrasa oraz dra Łukasza Bujnowicza.

Dotychczas wygłosiłem sześć ustnych wystąpień na konferencjach o międzynarodowym charakterze: International Workshop on EPR in Biology and Medicine 2004 oraz 2010 w Krakowie, Kongres PTBioch 2011 w Krakowie, Gordon Research Conference in Bioenergetics 2011 w Andover NH, Szkoła Zimowa Biotechnologii 2015 w Zakopanem, European Bioenergetics Conference w Budapeszcie 2018). Oprócz tego uczestniczyłem w wielu konferencjach międzynarodowych gdzie prezentowałem wyniki swoich badań w formie plakatów naukowych.

Literatura

1 Crofts AR (2004) The cytochrome bc_1 complex: function in the context of structure. *Annu. Rev. Physiol.* **66**, 689–733.

2 Al-Attar S & de Vries S (2013) Energy transduction by respiratory metallo-enzymes: From molecular mechanism to cell physiology. *Coord. Chem. Rev.* **257**, 64–80.

3 Sarewicz M & Osyczka A (2015) Electronic connection between the quinone and cytochrome *c* redox pools and its role in regulation of mitochondrial electron transport and redox signaling. *Physiol. Rev.* **95**, 219–243.

4 Nicholls DG & Ferguson SJ (2013) *Bioenergetics 4*, 4th ed. (C. H. Kim and T. Ozawa, eds.) Academic Press, Amsterdam.

5 Hunter CN, Daldal F, Thurnauer MC & Beatty JT (eds.) (2009) *The Purple Phototrophic Bacteria* Springer.

6 Cramer WA & Kallas T (2016) *Cytochrome complexes: Evolution, structures, energy transduction, and signaling* (W. A. Cramer and T. Kallas, eds.) Springer Science, Dordrecht.

7 Wikström MKF & Berden JA (1972) Oxidoreduction of cytochrome *b* in the presence of antimycin. *Biochim. Biophys. Acta* **283**, 403–420.

8 Mitchell P (1975) The protonmotive Q cycle: A general formulation. *FEBS Lett.* **59**, 137–139.

9 Crofts AR, Meinhardt SW, Jones KR & Snozzi M (1983) The role of the quinone pool in the cyclic electron-transfer chain of *Rhodopseudomonas sphaeroides*: a modified Q-cycle mechanism. *Biochim. Biophys. Acta* **723**, 202–218.

10 Boveris A & Cadenas E (1975) Mitochondrial production of superoxide anions and its relationship to the antimycin insensitive respiration. *FEBS Lett.* **54**, 311–314.

11 Cadenas E, Boveris A, Ragan CI & Stoppani AOM (1977) Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* **180**, 248–257.

12 Han D, Williams E & Cadenas E (2001) Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space. *Biochem. J.* **353**, 411–416.

13 Muller F, Crofts AR & Kramer DM (2002) Multiple Q-cycle bypass reactions at the Q_o site of the cytochrome bc_1 complex. *Biochemistry* **41**, 7866–7874.

14 Iwata S, Lee JW, Okada K, Lee JK, Iwata M, Rasmussen B, Link TA, Ramaswamy S & Jap BK (1998) Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome bc_1 complex. *Science* **281**, 64–71.

15 Berry EA, Huang L-S, Saechao LK, Pon NG, Valkova-Valchanova M & Daldal F (2004) X-Ray structure of Rhodobacter capsulatus cytochrome bc1: comparison with its mitochondrial and chloroplast counterparts. *Photosynth. Res.* **81**, 251–275.

16 Kurisu G, Zhang H, Smith JL & Cramer WA (2003) Structure of the cytochrome b_6f complex of oxygenic photosynthesis: tuning the cavity. *Science* **302**, 1009–1014.

17 Stroebel D, Choquet Y, Popot J-L & Picot D (2003) An atypical haem in the cytochrome b6f complex. *Nature* **426**, 413–418.

18 Zhang Z, Huang L-S, Shulmeister VM, Chi Y-I, Kim KK, Hung L-W, Crofts AR, Berry EA & Kim S-H (1998) Electron transfer by domain movement in cytochrome bc_1. *Nature* **392**, 677–684.

19 Darrouzet E, Moser CC, Dutton PL & Daldal F (2001) Large scale domain movement in cytochrome bc_1: a new device for electron transfer in proteins. *Trends Biochem. Sci.* **26**, 445–451.

20 Osyczka A, Moser CC, Daldal F & Dutton PL (2004) Reversible redox energy coupling in electron transfer chains. *Nature* **427**, 607–612.

21 Osyczka A, Moser CC & Dutton PL (2005) Fixing the Q cycle. *Trends Biochem. Sci.* **30**, 176–182.

22 Takamiya K-I & Dutton PL (1979) Ubiquinone in *Rhodopseudomonas sphaeroides*. Some thermodynamic properties. *Biochim. Biophys. Acta* **546**, 1–16.

23 Jünemann S, Heathcote P & Rich PR (1998) On the mechanism of quinol oxidation in the bc_1 complex. *J. Biol. Chem.* **273**, 21603–21607.

24 Zhu J, Egawa T, Yeh S-R, Yu L & Yu C-A (2007) Simultaneous reduction of iron-sulfur protein and cytochrome b_L during ubiquinol oxidation in cytochrome bc_1 complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 4864–4869.

25 Link TA (1997) The role of the "Rieske" iron sulfur protein in the hydroquinone oxidation (Q_P) site of the cytochrome bc_1 complex. *FEBS Lett.* **412**, 257–264.

26 Moser CC, Keske JM, Warncke K, Farid RS & Dutton PL (1992) Nature of biological electron transfer. *Nature* **355**, 796–802.

27 Page CC, Moser CC, Chen X & Dutton PL (1999) Natural engineering principles of electron tunnelling in biological oxidation-reduction. *Nature* **402**, 47–52.

28 Berry EA, De Bari H & Huang L-S (2013) Unanswered questions about the structure of cytochrome bc_1 complexes. *Biochim. Biophys. Acta* **1827**, 1258–1277.

29 Brugna M, Rodgers S, Schricker A, Montoya G, Kazmeier M, Nitschke W & Sinning I (2000) A spectroscopic method for observing the domain movement of the Rieske iron-sulfur protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 2069–2074.

30 Cooley JW, Roberts AG, Bowman MK, Kramer DM & Daldal F (2004) The raised midpoint potential of the [2Fe2S] cluster of cytochrome bc_1 is mediated by both the Q_o site occupants and the head domain position of the Fe-S protein subunit. *Biochemistry* **43**, 2217–2227.

31 Bowman MK, Berry EA, Roberts AG & Kramer DM (2004) Orientation of the g-tensor axes of the Rieske subunit in the cytochrome bc_1 complex. *Biochemistry* **43**, 430–436.

32 Cooley JW, Ohnishi T & Daldal F (2005) Binding dynamics at the quinone reduction (Q_i) site influence the equilibrium interactions of the iron sulfur protein and hydroquinone oxidation (Q_o) site of the cytochrome bc_1 complex. *Biochemistry* **44**, 10520–10532.

33 Roberts AG, Bowman MK & Kramer DM (2002) Certain metal ions are inhibitors of cytochrome b_6f complex "Rieske" iron-sulfur protein domain movements. *Biochemistry* **41**, 4070–4079.

34 Sarewicz M, Dutka M, Froncisz W & Osyczka A (2009) Magnetic interactions sense changes in distance between heme b_L and the iron-sulfur cluster in cytochrome bc_1. *Biochemistry* **48**, 5708–5720.

35 Rakowsky MH, More KM, Kulikov A V, Eaton GR & Eaton SS (1995) Time-domain electron paramagnetic resonance as a probe of electron-electron spin-spin interaction in spin-labeled low-spin iron porphyrins. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 2049–2057.

36 Budker V, Du J-L, Seiter M, Eaton GR & Eaton SS (1995) Electron-electron spin-spin interaction in spin-labeled low-spin methemoglobin. *Biophys. J.* **68**, 2531–2542.

37 Rao B. K. S, Tyryshkin AM, Roberts AG, Bowman MK & Kramer DM (2000) Inhibitory copper binding site on the spinach cytochrome b_6f complex: implications for Q_o site catalysis. *Biochemistry* **39**, 3285–3296.

38 Lyubenova S, Siddiqui MK, de Vries MJ, Ludwig B & Prisner TF (2007) Protein-protein interactions studied by EPR relaxation measurements: cytochrome *c* and cytochrome *c* oxidase. *J. Phys. Chem. B* **111**, 3839–3846.

39 Becker WF, von Jagow G, Anke T & Steglich W (1981) Oudemansin, strobilurin A, strobilurin B, and myxothiazol: new inhibitors of the bc1 segment of the respiratory chain with an e-β-methoxyacrylate system as common structural element. *FEBS Lett.* **132**, 329–333.

40 von Jagow G & Ohnishi T (1985) The chromone inhibitor stigmatellin-binding to the ubiquinol oxidation center at the C-side of the mitochondrial membrane. *FEBS Lett.* **185**, 311–315.

41 Sarewicz M, Borek A, Cieluch E, Świerczek M & Osyczka A (2010) Discrimination between two possible reaction sequences that create potential risk of generation of deleterious radicals

by cytochrome bc_1. Implications for the mechanism of superoxide production. *Biochim. Biophys. Acta* **1797**, 1820–1827.

42 Borek A, Kuleta P, Ekiert R, Pietras R, Sarewicz M & Osyczka A (2015) Mitochondrial disease-related mutation G167P in cytochrome *b* of *Rhodobacter capsulatus* cytochrome bc_1 (S151P in human) affects the equilibrium distribution of [2Fe-2S] cluster and generation of superoxide. *J. Biol. Chem.* **290**, 23781–23792.

43 Ekiert R, Borek A, Kuleta P, Czernek J & Osyczka A (2016) Mitochondrial disease-related mutations at the cytochrome *b*-iron-sulfur protein (ISP) interface: Molecular effects on the large-scale motion of ISP and superoxide generation studied in *Rhodobacter capsulatus* cytochrome bc_1. *Biochim. Biophys. Acta* **1857**, 1102–1110.

44 Darrouzet E, Valkova-Valchanova M, Moser CC, Dutton PL & Daldal F (2000) Uncovering the [2Fe2S] domain movement in cytochrome bc_1 and its implications for energy conversion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 4567–4572.

45 Sarewicz M, Borek A, Daldal F, Froncisz W & Osyczka A (2008) Demonstration of short-lived complexes of cytochrome *c* with cytochrome bc_1 by EPR spectroscopy: implications for the mechanism of interprotein electron transfer. *J. Biol. Chem.* **283**, 24826–24836.

46 Borek A, Sarewicz M & Osyczka A (2008) Movement of the iron-sulfur head domain of cytochrome bc_1 transiently opens the catalytic Q_o site for reaction with oxygen. *Biochemistry* **47**, 12365–12370.

47 Kolling DRJ, Brunzelle JS, Lhee S, Crofts AR & Nair SK (2007) Atomic resolution structures of Rieske iron-sulfur protein: role of hydrogen bonds in tuning the redox potential of iron-sulfur clusters. *Structure* **15**, 29–38.

48 Lhee S, Kolling DRJ, Nair SK, Dikanov SA & Crofts AR (2010) Modifications of protein environment of the [2Fe-2S] cluster of the bc_1complex: Effects on the biophysical properties of the Rieske iron-sulfur protein and on the kinetics of the complex. *J. Biol. Chem.* **285**, 9233–9248.

49 Ulyanov D, Bowler BE, Eaton GR & Eaton SS (2008) Electron-electron distances in spin-labeled low-spin metmyoglobin variants by relaxation enhancement. *Biophys. J.* **95**, 5306–5316.

50 Hagen WR, Hearshen DO, Sands RH & Dunham WR (1985) A statistical theory for powder EPR in distributed systems. *J. Magn. Reson.* **61**, 220–232.

51 Bertrand P, Gayda J-P & Rao KK (1982) Electron spin–lattice relaxation of the (4Fe–4S) ferredoxin from B. stearothermophilus. Comparison with other iron proteins. *J. Chem. Phys.* **76**, 4715–4719.

52 Bertrand P, Gayda J-P, Fee JA, Kuila D & Cammack R (1987) Comparison of the spin-lattice properties of the two classes of [2Fe-2S] clusters in proteins. *Biochim Biophys Acta* **916**, 24–28.

53 Gayda J-P, Bertrand P, Deville A, More C, Roger G, Gibson JF & Cammack R (1979) Temperature dependence of the electronic spin-lattice relaxation time in a 2-iron-2-sulfur protein. *Biochim. Biophys. Acta* **581**, 15–26.

54 Zhou Y, Bowler BE, Eaton GR & Eaton SS (1999) Electron spin lattice relaxation rates for S = 1/2 molecular species in glassy matrices or magnetically dilute solids at temperatures between 10 and 300 K. *J. Magn. Reson.* **139**, 165–174.

55 Robertson DE, Prince RC, Bowyer JR, Matsuura K, Dutton PL & Ohnishi T (1984) Thermodynamic properties of the semiquinone and its binding site in the ubiquinol-cytochrome c (c2) oxidoreductase of respiratory and photosynthetic systems. *J. Biol. Chem.* **259**, 1758–1763.

56 Robertson DE, Ding H, Chelminski PR, Slaughter C, Hsu J, Moomaw C, Tokito M, Daldal F & Dutton PL (1993) Hydroubiquinone-cytochrome c_2 oxidoreductase from *Rhodobacter capsulatus*: Definition of a minimal, functional isolated preparation. *Biochemistry* **32**, 1310–1317.

57 Crofts AR, Barquera B, Gennis RB, Kuras R, Guergova-Kuras M & Berry EA (1999) Mechanism of ubiquinol oxidation by the bc_1 complex: different domains of the quinol binding pocket and their role in the mechanism and binding of inhibitors. *Biochemistry* **38**, 15807–15826.

58 Snyder CH, Gutierrez-Cirlos EB & Trumpower BL (2000) Evidence for a concerted mechanism of ubiquinol oxidation by the cytochrome bc_1 complex. *J. Biol. Chem.* **275**, 13535–13541.

59 Ding H, Moser CC, Robertson DE, Tokito MK, Daldal F & Dutton PL (1995) Ubiquinone pair in the Q_o site central to the primary energy conversion reactions of cytochrome bc_1 complex. *Biochemistry* **34**, 15979–15996.

60 de Vries S, Albracht SP, Berden JA & Slater EC (1981) A new species of bound ubisemiquinone anion in QH_2: cytochrome *c* oxidoreductase. *J. Biol. Chem.* **256**, 11996–11998.

61 Cape JL, Bowman MK & Kramer DM (2007) A semiquinone intermediate generated at the Q_o site of the cytochrome bc_1 complex: Importance for the Q-cycle and superoxide production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 7887–7892.

62 Zhang H, Osyczka A, Dutton PL & Moser CC (2007) Exposing the complex III Q_o semiquinone radical. *Biochim. Biophys. Acta* **1767**, 883–887.

63 Vennam PR, Fisher N, Krzyaniak MD, Kramer DM & Bowman MK (2013) A caged, destabilized, free radical intermediate in the Q-cycle. *ChemBioChem* **14**, 1745–1753.

64 Leigh JS (1970) ESR rigid-lattice line shape in a system of two interacting spins. *J. Chem. Phys.* **52**, 2608–2612.

65 Cammack R, Rao KK & Hall DO (1971) Effects of chaotropic agents on the spectroscopic properties of spinach ferredoxin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **44**, 8–14.

66 Hirst J & Roessler MM (2016) Energy conversion, redox catalysis and generation of reactive oxygen species by respiratory complex I. *Biochim. Biophys. Acta* **1857**, 872–883.

67 Ohnishi T & King TE (1978) EPR and other properties of succinate dehydrogenase. *Methods Enzymol.* **53**, 483–495.

68 Czapla M, Borek A, Sarewicz M & Osyczka A (2012) Enzymatic activities of isolated cytochrome bc_1-like complexes containing fused cytochrome *b* subunits with asymmetrically inactivated segments of electron transfer chains. *Biochemistry* **51**, 829–835.

69 Fournel A, Gambarelli S, Guigliarelli B, More C, Asso M, Chouteau G, Hille R & Bertrand P (1998) Magnetic interactions between a $[4Fe–4S]^{1+}$ cluster and a flavin mononucleotide radical in the enzyme trimethylamine dehydrogenase: a high-field electron paramagnetic resonance study. *J. Chem. Phys.* **109**, 10905–10913.

70 Crofts AR, Rose SW, Burton RL, Desai A V, Kenis PJA & Dikanov SA (2017) The Q-Cycle Mechanism of the bc 1 Complex: A Biologist's Perspective on Atomistic Studies. *J. Phys. Chem. B* **121**, 3701–3717.

71 Sarewicz M, Dutka M, Pintscher S & Osyczka A (2013) Triplet state of the semiquinone-Rieske cluster as an intermediate of electronic bifurcation catalyzed by cytochrome bc_1. *Biochemistry* **52**, 6388–6395.

72 Świerczek M, Cieluch E, Sarewicz M, Borek A, Moser CC, Dutton PL & Osyczka A (2010) An electronic bus bar lies in the core of cytochrome bc_1. *Science* **329**, 451–454.

73 Czapla M, Cieluch E, Borek A, Sarewicz M & Osyczka A (2013) Catalytically-relevant electron transfer between two hemes b_L in the hybrid cytochrome bc_1-like complex containing a fusion of *Rhodobacter sphaeroides* and *capsulatus* cytochromes *b*. *Biochim. Biophys. Acta* **1827**, 751–760.

74 Sarewicz M, Szytuła S, Dutka M, Osyczka A & Froncisz W (2008) Estimation of binding parameters for the protein–protein interaction using a site-directed spin labeling and EPR spectroscopy. *Eur. Biophys. J.* **37**, 483–493.

75 Sarewicz M, Pietras R, Froncisz W & Osyczka A (2011) Reorientation of cytochrome c_2 upon interaction with oppositely charged macromolecules probed by SR EPR: implications for the role of dipole moment to facilitate collisions in proper configuration for electron transfer. *Metallomics* **3**, 404–409.

76 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.

77 Refojo PN, Teixeira M & Pereira MM (2012) The Alternative complex III: Properties and possible mechanisms for electron transfer and energy conservation. *BBA - Bioenerg.* **1817**, 1852–1859.

Marcin Sarewicz