

Patryk Kuleta
Zakład Biofizyki Molekularnej

Streszczenie pracy doktorskiej

Identyfikacja szlaku transportu protonów w obrębie centrum katalitycznego redukującego ubichinon (centrum Q_i) w cytochromie bc_1 .

Cytochrom bc_1 (mitochondrialny kompleks III) jest jednym z ważniejszych kompleksów przekształcających energię w błonach bioenergetycznych. Jako element szlaku transportu elektronów bierze udział w generowaniu siły protonomotorycznej niezbędnej do wytwarzania ATP w komórkach. Zachodzi to dzięki sprzężeniu transportu elektronów z aktywnym transportem protonów w poprzek błony. Zarówno transport elektronów jak i protonów w tym białku zachodzi z udziałem rozpuszczonych w błonie przenośników (chinonów). Cytochrom bc_1 dzięki unikalnej budowie i obecności dwóch centrów katalitycznych zlokalizowanych po przeciwnych stronach błony przeprowadza reakcje utleniania i redukcji chinonów. Redukcja chinonu zachodząca w centrum katalitycznym Q_i związana jest z pobieraniem protonów spoza błony do tego centrum. Dotychczasowe badania pozwoliły na stosunkowo dobre poznanie reakcji elektronowych w trakcie cyklu katalitycznego cytochromu bc_1 . Natomiast reakcje transportu protonów są słabo poznane głównie ze względu na brak łatwych i bezpośrednich metod ich obserwacji.

Celem niniejszej pracy doktorskiej było szczegółowe poznanie drogi transportu protonów w obrębie centrum katalitycznego Q_i cytochromu bc_1 z wykorzystaniem ukierunkowanej mutagenyzy i zaawansowanych metod spektroskopowych. Do tego celu wykorzystano układ modelowy jakim jest bakteryjny cytochrom bc_1 wykazujący wysokie podobieństwo do mitochondrialnego kompleksu III.

Na podstawie dostępnych danych literaturowych wywnioskowano, że protonowalne grupy aminokwasów: Lys251, Arg252 mogą mieć bezpośredni udział w reakcjach wiązania substratu (chinonu) oraz transportu protonów w obrębie centrum Q_i . Na podstawie tych założeń skonstruowano pojedyncze (K251M, D252N, D252A) oraz podwójne (K251M/D252N, K251M/D252A) muteiny cytochromu bc_1 , które poddano szczegółowej analizie kinetycznej. Wpływ tych mutacji na reakcje transportu protonów, na własności redoks kofaktorów oraz skorelowaną z tym generację stanu pośredniego reakcji w centrum Q_i (semichinonu), badano odpowiednio przy użyciu dwuwiązkowej impulsowej spektrofotometrii oraz spektroskopii elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR). Przeprowadzone dla tych mutein pomiarów indukowanych światłem reakcji redox w izolowanych błonach zawierających cytochrom bc_1 wskazują, że usunięcie tylko jednej grupy protonowalnej w obrębie miejsca katalitycznego powoduje spadek aktywności białka i utrudnia transport protonów ale nie blokuje go całkowicie.

Usunięcie obu grup protonowalnych jednocześnie (w przypadku mutantów podwójnych) powoduje całkowite zablokowanie transportu protonów i utratę funkcjonalności całego kompleksu. Ponadto wyniki obserwacji reakcji protonowych za pośrednictwem metody carotenoid bandshift (przesunięcia pasm karotenoidów w odpowiedzi na powstający potencjał elektryczny) i pomiary własności semichinonu powstającego w centrum Q_i dla tych mutantów potwierdzają te założenia. Przedstawione w pracy wyniki pozwalają na identyfikację specyficznego szlaku transportu protonów Lys251/Arg252 dostarczającego protony do centrum Q_i redukującego chinon w cytochromie bc_1 .

Część wyników otrzymanych w ramach tej pracy doktorskiej została opublikowana w dwóch artykułach naukowych:

1. **P. Kuleta**, M. Sarewicz, P. Postila, T. Róg, A. Osyczka, Identifying involvement of Lys251/Asp252 pair in electron transfer and associated proton transfer at the quinone reduction site of *Rhodobacter capsulatus* cytochrome bc_1 , *Biochimica Biophysica Acta - Bioenergetics* 1857 (2016), 1661-1668
2. P. A. Postila, K. Kaszuba, **P. Kuleta**, I. Vattulainen, M. Sarewicz, A. Osyczka, T. Róg, Atomistic determinants of co-enzyme Q reduction at the Q_i -site of the cytochrome bc_1 complex, *Scientific Reports* 6 (2016), doi:10.1038/srep33607