

## „Cytochromy sinicowe – struktura a właściwości”

Paweł Zatwarnicki

### Streszczenie pracy doktorskiej

W komórkach organizmów fotosyntezujących obecność mobilnych przenośników elektronów umożliwia oddziaływanie pomiędzy kluczowymi kompleksami błonowymi aparatu fotosyntetycznego. W obrębie dwuwarstwy fosfolipidowej, za transport elektronów pomiędzy fotosystemem II a kompleksem cytochromów  $b_6f$  odpowiadają cząsteczki plastochinonu. W lumen tylakoidów, pomiędzy kompleksem cytochromów  $b_6f$  a fotosystemem I, elektrony transportowane są przez metaloproteiny: cytochrom  $c_6$  i/lub plastocyjaninę. Cykl przepływu elektronów rozpoczyna się, gdy elektron przekazywany jest z cytochromu  $f$  (będącego częścią kompleksu  $b_6f$ ) na utlenioną formę metaloprotein (cytochrom  $c_6$  związany z kationem  $Fe^{3+}$  lub plastocyjaninę związaną z kationem  $Cu^{2+}$ ). W rezultacie powstaje zredukowany nośnik elektronów, który w lumen przemieszcza się w stronę fotosystemu I. Cykl przepływu elektronów zamyka się, gdy elektron przekazywany jest z metaloproteiny na fotoutleniony dimer cząsteczek chlorofilu P700<sup>+</sup>.

Fotosyntetyczny transport elektronów to nie jedyna funkcja sinicowych cytochromów  $c_6$  oraz plastocyjaniny. W obrębie błon tylakoidów, fotosyntetyczny i oddechowy łańcuch transportu elektronów fizycznie nakładają się ze sobą. Analogiczne kompleksy białkowe zlokalizowane w błonach cytoplazmatycznych są z kolei odpowiedzialne wyłącznie za oddechowy łańcuch transportu elektronów. Tym samym, kompleks cytochromów  $b_6f$ , pula chinonów oraz cytochrom  $c_6$  zostały uznane za elementy wspólne sinicowych procesów oddychania i fotosyntezy. Trzecim procesem, w który zaangażowane są sinicowe cytochromy  $c_6$ , to proces anoksygeniczej fotosyntezy, gdzie źródłem elektronów jest siarkowodór. W procesie tym, cytochrom  $c_6$  przenosi elektrony z puli chinonów na centra żelazowo-siarkowe w procesie anaerobowego utleniania siarczków.

Pomijając dość dobrze poznaną i scharakteryzowaną grupę cytochromów  $c_6$ , w genomach wielu gatunków sinic można odnaleźć sekwencje kodujące cytochromy podobne do  $c_6$  (*ang.* cytochromes  $c_6$ -like). W przeciwieństwie do klasycznych cytochromów  $c_6$ , cytochromy te są grupą białek o nieznannej funkcji i słabo określonych właściwościach.

Badania prowadzone w ciągu ostatnich lat w Zakładzie Biofizyki doprowadziły do wyodrębnienia dwóch nowych grup cytochromów podobnych do  $c_6$ . W związku z wcześniejszym odkryciem roślinnych cytochromów  $c_{6A}$ , grupy te nazwano analogicznie  $c_{6B}$  oraz  $c_{6C}$ . Chloroplastowe cytochromy  $c_{6A}$  są dość blisko spokrewnione z rodziną sinicowych cytochromów  $c_{6B}$ . Geny kodujące cytochromy  $c_{6B}$  obecne są głównie w genomach gatunków morskich sinic niezdolnych do wiązania azotu - *Prochlorococcus* oraz *Synechococcus*. Z kolei sinice wiążące azot, jednokomórkowe bądź wytwarzające heterocysty, często zawierają w genomach sekwencje kodujące cytochromy z grupy  $c_{6C}$ . Ciekawym wyjątkiem w tej grupie jest cytochrom PetJ2 z sinicy *Synechococcus sp. PCC 7002*, nie posiadającej genów *nif*.

Obecność genów kodujących cytochromy podobne do  $c_6$  w genomach wielu sinic daje podstawy do rozszerzenia hipotez dotyczących funkcji tychże białek w procesach biochemicznych komórek sinicowych. Różnorodność gatunkowa sinic posiadających geny cytochromów podobnych do  $c_6$  wskazuje, że ta rodzina białek pojawiła się stosunkowo wcześnie w historii ewolucji sinic. W porównaniu do ogromu prac naukowych traktujących o cytochromach w ogóle, cytochromy podobne do  $c_6$  są niemalże niezauważalne w literaturze. W związku z powyższym, autor tej rozprawy podczas pracy doktorskiej podjął się prac mających na celu poszerzenie wiedzy dotyczącej cytochromów  $c_6$ , a w szczególności cytochromów podobnych do  $c_6$ . Celem nadrzędnym było uzyskanie struktur krystalograficznych tychże cytochromów i odniesienie ich do podstawowych właściwości biochemicznych.

Praca ta jest poświęcona w dużej mierze trzem cytochromom: PetJ1 (przedstawiciel rodziny cytochromów  $c_6$ ), PetJ2 (przedstawiciel rodziny cytochromów  $c_{6C}$ ) z *Synechococcus sp. PCC 7002* oraz cytochromowi  $c_{6B}$  z *Synechococcus sp. WH 8102*.

Pierwszy projekt składający się na ogół pracy doktorskiej dotyczył określenia funkcji unikalnej dla sinicowych cytochromów  $c_6$  pętli K<sub>44</sub>-S<sub>49</sub>, zlokalizowanej pomiędzy II. a III. helisą  $\alpha$  cytochromu PetJ1 z *Synechococcus sp.* PCC 7002. Transformacja komórek sinicowych genem *petJ1* z usuniętą sekwencją kodującą unikalną pętlę pokazała, że komórki sinicy nie są w stanie prawidłowo funkcjonować, jeśli z cytochromu PetJ1 usunięta zostanie pętla K<sub>44</sub>-S<sub>49</sub>. Stosując ekspresję heterologiczną w komórkach *E. coli* uzyskano cytochrom PetJ1 dl6 – z usuniętą pętlą. Dalsza badania pozwoliły określić wpływ pętli na właściwości biochemiczne. Usunięcie pętli skutkuje spadkiem potencjału redoks z +333.4 mV (typ dziki PetJ1) do +235.8 mV (mutant delecyjny PetJ1 dl6). Bez istotnych zmian pozostał za to punkt izoelektryczny oraz właściwości spektralne (absorbancja w zakresie UV-Vis). Pomimo wielu prób, nie udało się uzyskać kryształów białkowych, które mogłyby być wykorzystane do rozwiązania struktury krystalograficznej i dalej – do rzetelnego wyjaśnienia funkcji unikalnej pętli.

Kolejnym elementem pracy doktorskiej było porównanie struktur i właściwości cytochromu PetJ1 *Synechococcus sp.* PCC 7002 z jego mutantem punktowym PetJ1 Q57V. Badania pokazały, że zamiana glutaminy na walinę w obrębie kieszeni hemowej (pozycja 57) skutkuje znaczącym obniżeniem potencjału redoks: z +333.4 mV (typ dziki PetJ1) do +239.4 mV (PetJ1 Q57). Dodatkowo zaobserwowano efekt batochromowy (przesunięcie maksimum absorpcji pasma  $\alpha$  zredukowanego cytochromu w stronę światła czerwonego: z 553.2 nm do 555.9 nm). Bez zmian pozostał punkt izoelektryczny. Rozwiązanie struktury krystalograficznej mutantu PetJ1 Q57V (PDB:4EID, rozdzielczość 1.13 Å) i porównanie go ze strukturą cytochromu PetJ1 typu dzikiego pozwoliło na wyjaśnienie natury tych zmian.

Trzeci element pracy doktorskiej to porównania struktur i właściwości cytochromu PetJ2 *Synechococcus sp.* PCC 7002 oraz jego mutantu punkowego PetJ2 L50Q. W tym przypadku potwierdzono ponownie, że obecność reszty aminokwasowej z polarnym łańcuchem bocznym w obrębie kieszeni hemowej ma istotny wpływ na właściwości biochemiczne. Zamiana hydrofobowego łańcucha bocznego leucyny na hydrofilowy łańcuch glutaminy w pozycji 50 cytochromu PetJ2 skutkuje podniesieniem potencjału redoks ze +150.2 mV do +202.9 mV. Obserwuje się też efekt hipsochromowy (przesunięcie maksimum absorpcji pasma  $\alpha$  zredukowanego

cytochromu w stronę światła czerwonego: PetJ2 WT: 556,1 nm; PetJ2 L50Q: 553,5 nm). Dalsze prace umożliwiły rozwiązanie struktur krystalograficznych cytochromu PetJ2 typu dzikiego (PDB: 4EIE, rozdzielczość 1.03 Å) oraz mutantu punktowego L50Q (PDB:4EIF, rozdzielczość 1.04 Å). Porównanie struktur pokazało, że mutacja punktowa nie wpływa na ogólną strukturę trzeciorzędową, a jedynie na sieć oddziaływań wodorowych w obrębie kieszeni hemowej, co tłumaczy zmiany właściwości biochemicznych. Struktury cytochromu PetJ2 typu dzikiego oraz mutantu punktowego PetJ2 L50Q są pierwszymi strukturami cytochromów  $c_{6C}$  opublikowanymi w bazie PDB.

Ostatni, najważniejszy element pracy doktorskiej to określenie właściwości i struktury cytochromu  $c_{6B}$  z *Synechococcus* sp. WH 8102. Strukturę tego cytochromu, udokładnioną do rozdzielczości 1.40 Å, zdeponowano w bazie PDB pod kodem dostępu 4KMG. Jest to pierwsza struktura białka z rodziny cytochromów  $c_{6B}$  zdeponowana w bazie PDB. Unikalna dla tego cytochromu jest struktura  $\beta$ -spinki, obecna za III helisą  $\alpha$ . Porównanie właściwości tegoż cytochromu z cytochromem PetJ1 *Synechococcus* sp. PCC 7002 pokazało szereg różnic. Zwraca uwagę przede wszystkim niski potencjał redoks: 113.2 mV (PetJ1: 333.4 mV), odmienne właściwości spektralne (maksimum absorpcji pasma  $\alpha$  zredukowanego cytochromu przy 557.0 nm) oraz niezwykle wysoki moment dipolowy (1025 D w porównaniu do 204 D cytochromu PetJ1).

Oprócz wspomnianych powyżej głównych elementów pracy doktorskiej, autor podjął się również prób uzyskania struktur krystalograficznych: cytochromu  $c_M$  z *Synechococcus* sp. PCC 7002 oraz cytochromu  $f$  z *Thermosynechococcus elongatus* BP-1. Mimo wielu prób, dla cytochromu  $c_M$  nie udało się wyhodować żadnych kryształów, natomiast dla cytochromu  $f$  wyhodowano kryształy w kilku warunkach z których nie udało zarejestrować się danych dyfrakcyjnych.

Część wyników tejże pracy doktorskiej przedstawiono w formie struktur zdeponowanych w bazie PDB (kody dostępu: 4EID, 4EIE, 4EIF, 4KMG), komunikatów zjazdowych (36th Annual Midwest/Southeast Photosynthesis Meeting, Marshall, USA, 10.2010), plakatów (DGK-AK1 Workshop - Diffraction Data Collection Using Synchrotron Radiation, Berlin, Niemcy, 07.2011) oraz publikacji (Zatwarnicki i wsp. „Cytochrome  $c_{6B}$  of *Synechococcus* sp. WH 8102 –

Crystal structure and basic properties of novel  $c_6$ -like family representative”, zaakceptowane w BBRC). Pozostałe rezultaty badań są przygotowywane do druku.