

Molekularne efekty mutacji mitochondrialnych w genie kodującym cytochrom *b* kompleksu III i ich wpływ na poziom produkcji wolnych rodników

Arkadiusz Borek

Robert Ekiert

Artur Osyczka ✉

Zakład Biofizyki Molekularnej; Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii; Uniwersytet Jagielloński, Kraków

✉ Zakład Biofizyki Molekularnej; Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii; Uniwersytet Jagielloński; ul. Gronostajowa 7, 30-387 Kraków; tel.: (12) 664 63 48; e-mail: artur.osyczka@uj.edu.pl

Artykuł otrzymano 17 maja 2016 r.

Artykuł zaakceptowano 23 maja 2016 r.

Słowa kluczowe: cytochrom *b*, mitochondrialny kompleks III, mutacje mitochondrialne, ruch domeny białkowej, ROS, anionorodnik ponadtlenkowy

Wykaz skrótów: ATP – adenozyntroójfosforan; EPR (ang. *electron paramagnetic resonance*) – elektronowy rezonans paramagnetyczny; ISP (ang. *iron-sulfur protein*) – białko żelazowo-siarkowe; ISP-HD (ang. *head domain of iron-sulfur protein*) – główka białka żelazowo-siarkowego; $O_2^{\cdot -}$ – anionorodnik ponadtlenkowy; ROS (ang. *reactive oxygen species*) – reaktywne formy tlenu; SQ_0 – semichinon w miejscu katalitycznym utleniania chinolu; WT (ang. *wild type*) – forma natywna

STRESZCZENIE

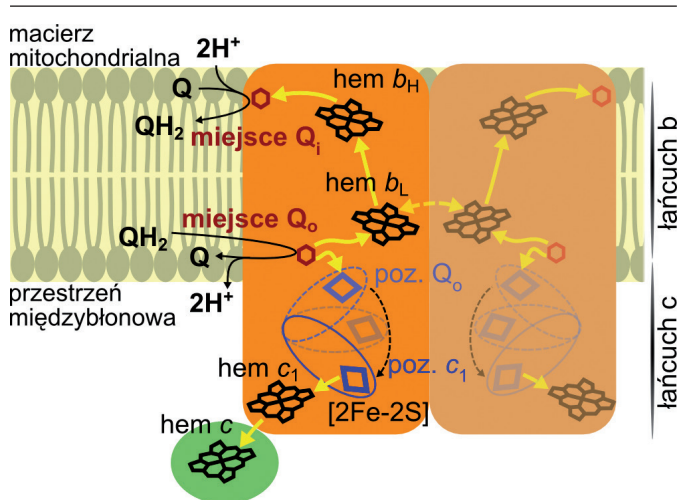
Cytochrom bc_1 (mitochondrialny kompleks III) występuje powszechnie w układach bioenergetycznych. Enzym ten katalizuje przeniesienie elektronów z ubichinolu na cytochrom *c* sprzężone z translokacją protonów i tym samym przyczynia się do generowania siły protonomotorycznej wykorzystywanej do produkcji ATP. Cytochrom *b* razem z cytochromem c_1 i białkiem żelazowo-siarkowym (ISP) tworzą zachowany w ewolucji rdzeń katalityczny. W obrębie tego enzymu, transfer elektronów jest możliwy dzięki ruchomej domenie ISP, która poprzez zmianę swojej pozycji umożliwia komunikację między cytochromem *b* a cytochromem c_1 . Mutacje w tych podjednostkach mogą być przyczyną chorób mitochondrialnych, jednakże poznanie ich efektów molekularnych w komórkach ludzkich jest utrudnione. Dlatego w badaniach wykorzystuje się systemy modelowe w komórkach drożdżowych oraz bakteryjnych. Okazuje się, że niektóre mutacje w cytochromie *b* wpływają na ruch ISP i w efekcie na poziom produkcji wolnych rodników. Badania tego typu przyczyniają się do wyjaśnienia podłoża molekularnego chorób mitochondrialnych oraz mogą pomóc w zrozumieniu mechanizmów reakcji zachodzących w cytochromie bc_1 .

BUDOWA I MECHANIZM DZIAŁANIA CYTOCHROMU bc_1

FUNKCJA CYTOCHROMU bc_1

Cytochrom *b* jest podjednostką cytochromu bc_1 , jednego z kilku białek łańcucha oddechowego uczestniczących w budowaniu gradientu protonomotorycznego. Enzym ten należy do grupy cytochromów *bc* występujących powszechnie w układach bioenergetycznych. W mitochondrialnym łańcuchu oddechowym cytochrom bc_1 nazywany jest kompleksem III. Występuje on również w komórkach prokariotycznych (pod nazwą cytochrom bc_1), a w chloroplastach jego odpowiednikiem jest cytochrom b_6f . Cytochrom *b* razem z cytochromem c_1 i białkiem żelazowo-siarkowym (ISP) tworzą rdzeń katalityczny cytochromu bc_1 , w obrębie którego zachodzi przekaz elektronów z błonowego, dwuelektronowego przenośnika elektronów, ubichinolu, na jednoelektronowy, pozabłonowy przenośnik elektronów, cytochrom *c*. W wyniku tej reakcji następuje utlenianie ubichinolu połączone z uwolnieniem protonów w miejscu katalitycznym Q_0 zlokalizowanym po stronie mitochondrialnej przestrzeni międzybłonowej (peryplazmy u bakterii), redukcja ubichinonu połączona z pobraniem protonów w miejscu katalitycznym Q_i po stronie macierzy w mitochondriach (cytoplazmy u bakterii) oraz redukcja cytochromu *c* po stronie mitochondrialnej przestrzeni międzybłonowej (peryplazmy) w miejscu oddziaływania cytochromu c_1 z cytochromem *c* (Ryc. 1). Ponieważ miejsca katalityczne związane z redukcją/utlenianiem ubichinonu/ubichinolu znajdują się po różnych stronach błony, możliwe jest przeniesienie protonów w poprzek błony mitochondrialnej (translokacja protonów).

W mitochondrialnym łańcuchu oddechowym (Ryc. 2) protony pochodzące z macierzy mitochondrialnej są wprowadzane do błony w postaci ubichinolu, który powstaje w wyniku reakcji redukcji ubichinonu zachodzącej w kompleksach I, II i III. W kompleksie I do redukcji ubichinonu wykorzystywane są elektrony pochodzące z utleniania NADH. W kompleksie II elektrony pochodzą z utleniania bursztynianu. Wyjątkowość reakcji redukcji ubichinonu zachodzącej w miejscu Q_i kompleksu III polega na tym, że elektrony nie pochodzą bezpośrednio z substratów (jak w przypadku kompleksów I i II), lecz pochodzą z utleniania ubichinolu w miejscu Q_0 kompleksu III, w którym przeprowadzana jest unikalna w świecie przyrody reakcja bifurkacji (Ryc. 1, Ryc. 3A a). W wyniku tej reakcji tylko jeden elektron pochodzący z utlenienia jednej cząsteczki ubichinolu jest wprowadzany do puli cytochromu *c*. Drugi elektron (za pośrednictwem hemu b_L i b_H) jest przekazywany do miejsca redukcji ubichinonu Q_i i w efekcie do puli ubichinonu w błonie [1,2]. Połączenie działania miejsc katalitycznych Q_0 i Q_i jest powiązane z translokacją pro-



Rycina 1. Schemat reakcji zachodzących w obrębie dimeru cytochromu bc_1 . Łańcuch wysokopotencjalowy (łańcuch c) łączy miejsce utleniania ubichinolu (miejsce Q_o) i miejsce redukcji cytochromu c (białko oznaczone jest zieloną elipsą) poprzez kofaktory: klaster $[2Fe-2S]$ i hem c_1 . Łańcuch niskopotencjalowy (łańcuch b) łączy miejsce Q_o i miejsce redukcji ubichinonu (miejsce Q_i) poprzez hem b_L i hem b_H . Żółte strzałki oznaczają transfer elektronu. Żółta przerywana strzałka oznacza transfer elektronu pomiędzy hemami b_L dwóch monomerów. Domena białka ISP, w której znajduje się klaster $[2Fe-2S]$ (oznaczony niebieskim rombem) wykonuje ruch (czarna przerywana strzałka) między pozycją blisko miejsca Q_o (poz. Q_o) a pozycją blisko hemu c_1 (poz. c_1). Dla uproszczenia schematu, podjednostki tworzące rdzeń katalityczny jednego monomeru: cytochrom b , cytochrom c_1 i białko żelazowo-siarkowe zostały przedstawione jako pomarańczowy prostokąt, drugi monomer jest wycieniowany. Schemat nie uwzględnia stechiometrii cyklu Q zamieszczonej na rycinie 2.

tonów w poprzek błony. Poza przenoszeniem protonów związanym bezpośrednio z reakcją redukcji ubichinonu, kompleksy I i IV działają również jako pompy protonowe i przenoszą protony z macierzy do przestrzeni międzybłonowej (Ryc. 2) generując siłę protonomotoryczną.

W wyniku reakcji utleniania ubichinolu, która w mitochondrialnym łańcuchu oddechowym zachodzi tylko w miejscu Q_o kompleksu III, następuje uwolnienie protonów „uwięzionych” w cząsteczce ubichinolu do przestrzeni międzybłonowej. Gradient protonów budowany przez kompleksy I, II, III i IV jest wykorzystywany przez

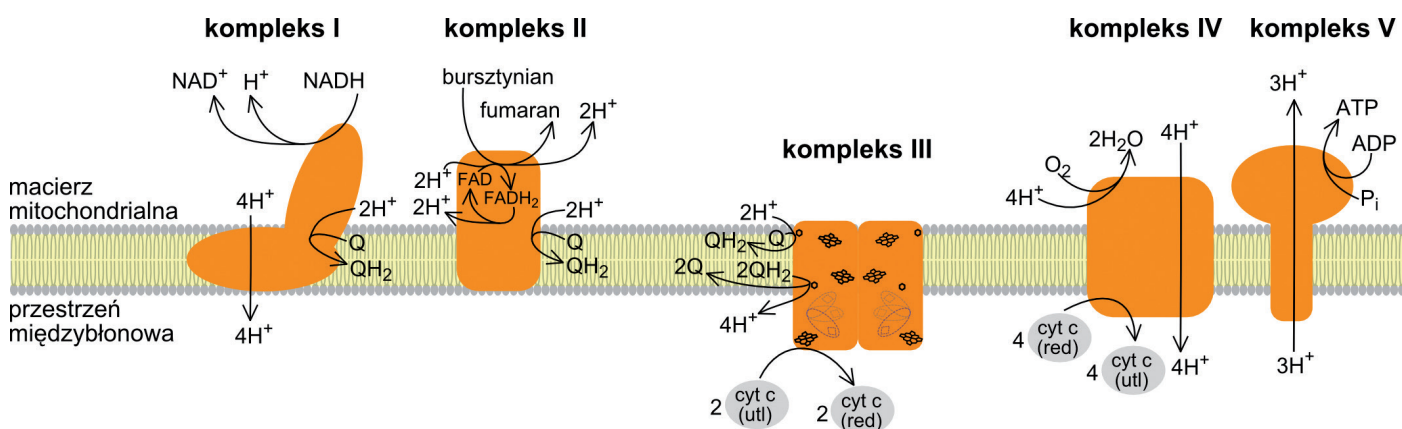
inne białko łańcucha oddechowego, kompleks V, do syntezy ATP. Zwiększenie stężenia ATP powoduje odsunięcie układu ATP, ADP i P_i od stanu równowagi, co leży u podstaw konwersji energii w metabolizmie komórkowym (więcej informacji o cytochromie bc_1 w pracy przeglądowej [3]).

KATALITYCZNY CYKL Q ORAZ ROZMIESZCZENIE KOFAKTORÓW W CYTOCHROMIE bc_1

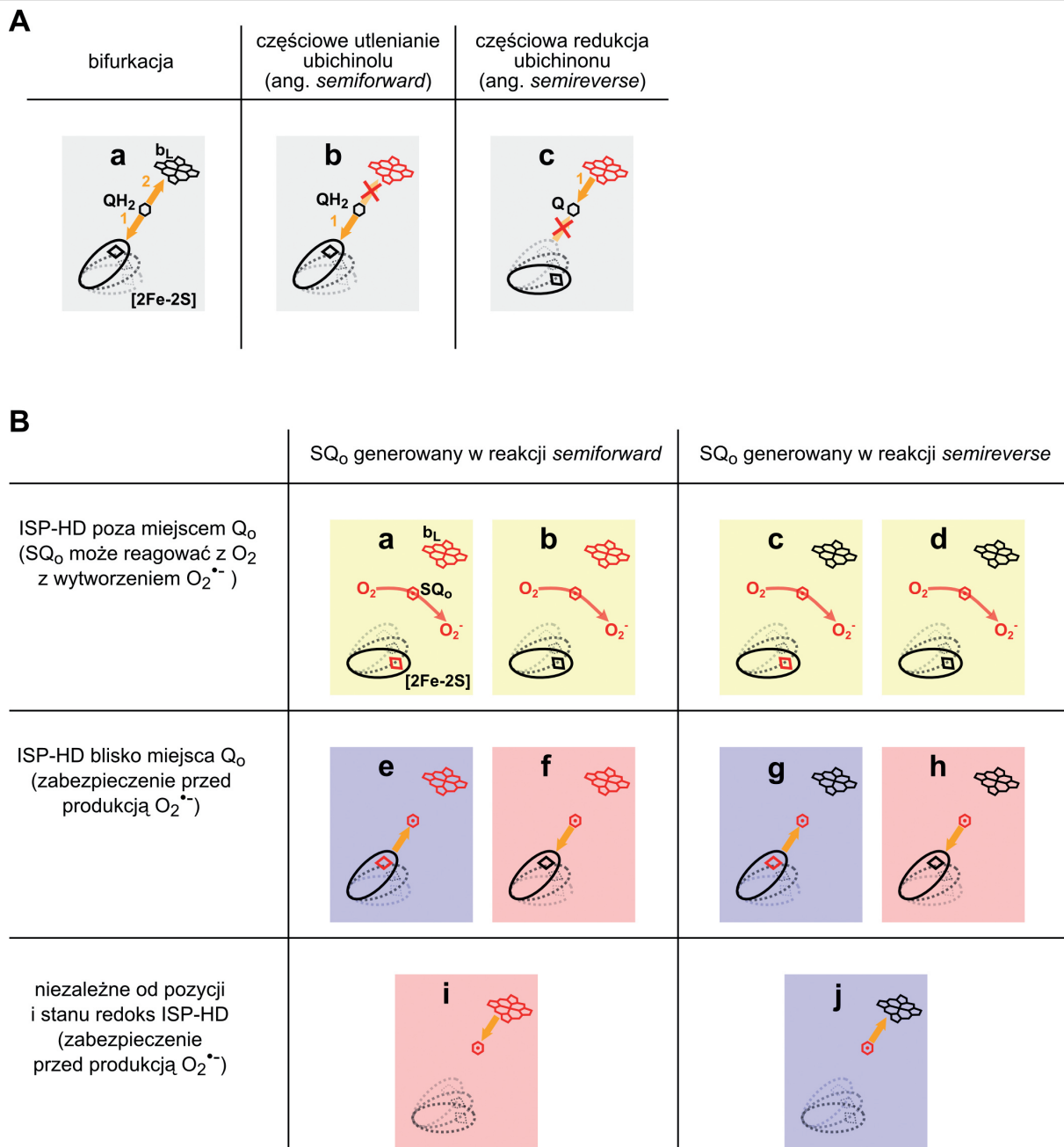
Kompletny cykl reakcji katalitycznych cytochromu bc_1 (cykl Q) [1,2,4] zachodzi w dwóch łańcuchach kofaktorów umieszczonych w podjednostkach budujących rdzeń katalityczny (Ryc. 1).

W łańcuchu wysokopotencjalowym (łańcuch c), miejsce katalityczne Q_o jest połączone z miejscem redukcji cytochromu c poprzez dwa kofaktory: klaster żelazowo-siarkowy (klaster $[2Fe-2S]$) osadzony w białku ISP oraz hem c_1 osadzony w cytochromie c_1 . W obrębie tego łańcucha, transfer elektronów jest możliwy dzięki przemieszczaniu się domeny białka ISP (tzw. główka białka ISP, ISP-HD), która wykonuje ruch między miejscem blisko centrum katalitycznego Q_o (pozycja Q_o) a miejscem blisko cytochromu c_1 (pozycja c_1) [5-11]. Na drodze tej domeny białkowej znajduje się pętla ef cytochromu b , która stanowi barierę steryczną dla zmiany pozycji ISP-HD [6,12,13]. Na szczególną uwagę zasługuje położenie regionu zawiasowego ISP (jest to fragment białka łączący helisę transbłonową ISP z ISP-HD), która jest zlokalizowana w pobliżu helisy $cd2$ cytochromu b znajdującej się u wejścia do miejsca katalitycznego Q_o . Helisa $cd2$ razem z sąsiadującą helisą $cd1$ stanowią fragmenty cytochromu b , które definiują niszę do której wiąże się substrat, ubichinol. Interesujące jest to, że mutacje wprowadzone na tych dwóch helisach mogą wpływać na dostępność miejsca katalitycznego dla substratu [14], jak i poprzez sąsiedztwo regionu zawiasowego białka ISP, zmieniać ISP-HD [15].

W łańcuchu niskopotencjalowym (łańcuch b) miejsce katalityczne Q_o jest połączone z miejscem Q_i poprzez kofaktory: hem b_L oraz hem b_H osadzone w cytochromie



Rycina 2. Ogólny schemat reakcji mitochondrialnego łańcucha oddechowego. Kompleksy I i II redukują ubichinon do ubichinolu i tym samym „wprowadzają” elektrony i protony do błony. Poprzez redukcję ubichinonu do ubichinolu w cyklu Q, kompleks III również wprowadza protony do błony. Kompleks III jest łącznikiem między pulą ubichinonu w błonie a cytochromem c w przestrzeni międzybłonowej. W reakcji utleniania ubichinolu uwalnia on protony z błony mitochondrialnej do przestrzeni międzybłonowej. Kompleks V wykorzystuje gradient protonomotoryczny generowany przez kompleksy I, II, III i IV do syntezy ATP. Strzałki w poprzek błony oznaczają transport jonów H^+ odbywający się na zasadzie pompy protonowej. Dla każdego kompleksu pokazana jest ogólnie przyjęta stechiometria przeprowadzanej reakcji enzymatycznej.



Rycina 3. Katalityczne i uboczne reakcje zachodzące w miejscu Q_o cytochromu bc₁. A. Schemat reakcji bifurkacji i powstawania semichinonu (SQ₀). Panel „a” przedstawia reakcję bifurkacji w miejscu Q_o, w wyniku której w reakcji dwuelektronowego utleniania ubichinolu następuje przekaz jednego elektronu na utleniony klasterek [2Fe-2S] (reakcja 1), a drugiego elektronu - na utleniony hem b_L (reakcja 2). Panel „b” przedstawia reakcję częściowego utleniania ubichinolu (ang. *semiforward*), w wyniku której następuje przekaz tylko jednego elektronu z ubichinolu (reakcja 1) na utleniony klasterek [2Fe-2S], z wytworzeniem SQ₀. Panel „c” przedstawia reakcję częściowej redukcji ubichinonu (ang. *semireverse*), w wyniku której następuje przekaz elektronu ze zredukowanego hemu b_L (reakcja 1) na ubichinon w miejscu Q_o i wytworzenie SQ₀. Pomarańczowa strzałka oznacza transfer elektronów. B. Schemat możliwych reakcji z udziałem SQ₀. Po lewej stronie pokazane są możliwe scenariusze reakcji SQ₀ (oznaczone jako sześciokąt z kropką) powstałego w reakcji *semiforward* (Ryc. 3A b). Po prawej stronie natomiast pokazane są scenariusze reakcji SQ₀ powstałego w reakcji *semireverse* (Ryc. 3A c). Stany, w których generowany jest anionorodnik ponadtlenkowy są pokazane na jasnożółtym tle (a-d). Stany w których nie powstają rodniki to: reakcje „zwarcia” przedstawione na różowym tle (f, h, i) oraz reakcje „neutralne” na fioletowym tle (e, g, j). We wszystkich panelach stan redoks kofaktorów przedstawiony jest kolorami: czerwony - zredukowany, czarny - utleniony. Reakcja SQ₀ z tlenem jest oznaczona czerwoną strzałką (a-d), natomiast reakcje kompetycyjne z klastrem [2Fe-2S] oraz z hemem b_L oznaczone są pomarańczową strzałką (e-j).

b. W kompletnym cyklu Q utleniane są dwie cząsteczki ubichinolu. Po utlenieniu pierwszej cząsteczki ubichinolu w miejscu Q_o, jeden elektron przechodzi przez łańcuch c i jest wykorzystywany do redukcji jednej cząsteczki cytochromu c, natomiast drugi przechodzi przez łańcuch b i jest wykorzystywany w miejscu Q_i do redukcji ubichinonu do semichinonu. Elektrony dostarczane przez utlenianie drugiej cząsteczki ubichinolu w miejscu Q_o są wykorzystywane do redukcji jeszcze jednej cząsteczki cy-

tochromu c w miejscu redukcji cytochromu c na cytochromie c₁ i do redukcji semichinonu do ubichinolu w miejscu Q_i.

Ten skomplikowany mechanizm katalizy prowadzonej przez cytochrom bc₁ został utrwalony w toku ewolucji prawdopodobnie dlatego, że umożliwia zwiększenie wydajności energetycznej enzymu poprzez zwiększenie ilości przenoszonych protonów. Dzięki temu zwiększa

się wydajność całego łańcucha oddechowego i znacznie wzrasta udział cytochromu bc_1 w budowaniu siły protonomotorycznej.

Zastanawiające jest dlaczego cytochrom bc_1 zawsze występuje w postaci homodimeru, podczas gdy każdy z monomerów posiada wszystkie elementy niezbędne do przeprowadzenia reakcji katalitycznej [16]. Ostatnie badania dowiodły istnienia funkcjonalnego połączenia obu monomerów pomiędzy hemami b_L , które umożliwia transfer elektronów [17-22]. Dzięki temu zwiększa się ilość możliwych połączeń między miejscami katalitycznymi Q_o i Q_i , co może być korzystne w przypadku zablokowania przepływu elektronów w obrębie monomeru. Można przypuszczać, że jest to swoiste zabezpieczenie enzymu przed niepożądanymi reakcjami mogącymi prowadzić między innymi do zwiększonej produkcji wolnych rodników [3,23]. Fizjologiczna rola komunikacji między monomerami jest wciąż przedmiotem dyskusji [3,18,20,24-26].

REAKCJE UBOCZNE CYKLU Q

Poza reakcjami katalitycznymi cyklu Q, możliwe są również reakcje uboczne (Ryc. 3B), które powodują obniżenie wydajności bifurkacji elektronów w miejscu katalitycznym Q_o [27-29]. Skutkuje to zmniejszeniem wydajności translokacji protonów, co z kolei przyczynia się do obniżenia wydajności fosforylacji oksydacyjnej. Możliwe są również reakcje uboczne prowadzące do powstania anionorodnika ponadtlenkowego, jednej z reaktywnych form tlenu (ROS) [29,30].

Produkcja anionorodnika ponadtlenkowego w miejscu Q_o

Najbardziej niebezpiecznymi reakcjami ubocznymi są reakcje prowadzące do powstania anionorodnika ponadtlenkowego. Rodnik ten generowany jest podczas reakcji semichinonu utworzonego w miejscu Q_o (SQ_o) z tlenem [31,32]. W wyniku tej reakcji oprócz utworzenia rodnika, który powoduje uszkodzenia w komórce, następuje obniżenie wydajności translokacji protonów.

Semichinon w miejscu Q_o może powstać w wyniku dwóch reakcji (Ryc. 3A): częściowego utleniania ubichinolu (ang. *semiforward*) lub częściowej redukcji ubichinonu (ang. *semireverse*) [29]. W reakcji *semiforward*, będącej częścią reakcji katalitycznej utleniania ubichinolu w miejscu Q_o , ubichinol oddaje jeden elektron na klaster [2Fe-2S] białka ISP z wytworzeniem SQ_o (Ryc. 3A b), natomiast drugi elektron z SQ_o nie może być przekazany na hem b_L i dokończyć reakcję utleniania ubichinolu, ponieważ jest on już w formie zredukowanej i nie może przyjąć elektronu [32,33]. W reakcji *semireverse*, będącej częścią reakcji odwrotnej miejsca Q_o (reakcji redukcji ubichinonu), ubichinon przyjmuje elektron od hemu b_L z wytworzeniem SQ_o (Ryc. 3A c), natomiast utleniony klaster [2Fe-2S] białka nie jest w stanie przekazać drugiego elektronu na SQ_o aby dokończyć reakcję odwrotną [29,30,34,35].

Interesujące jest to, że w zasadzie obie reakcje wyjaśniają ogólny mechanizm produkcji anionorodnika po-

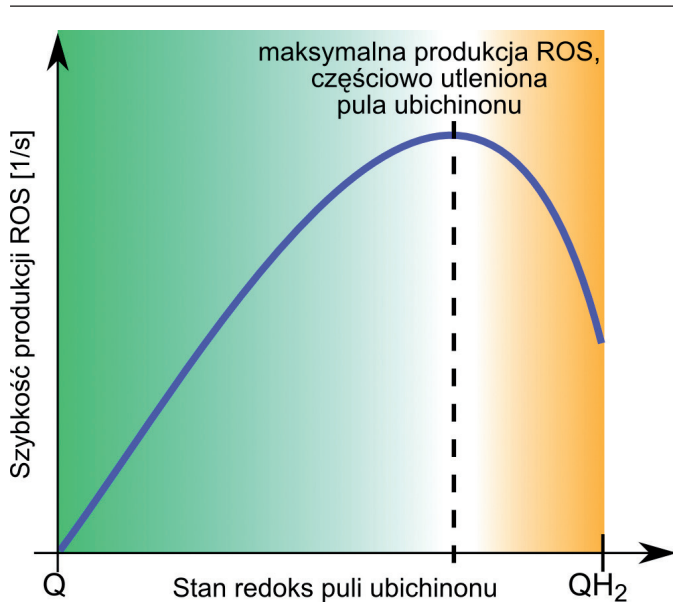
nadtlenkowego w obecności inhibitora miejsca Q_i , antymycyny, jednak tylko reakcja *semireverse* tłumaczy obserwowane w badaniach maksimum szybkości produkcji rodników pojawiające się w warunkach częściowo utlenionej puli ubichinonu (Ryc. 4) [15,34,36]. To maksimum jest konsekwencją roli jaką pełni ubichinon w reakcji *semireverse*, jest on substratem dla semichinonu powstającego w miejscu Q_o . Produkcja rodników z jednej strony jest „napędzana” przez ubichinol, który dostarcza elektrony na łańcuch b, a z drugiej strony jest regulowana przez ubichinon. Ubichinon pełni w tej regulacji podwójną rolę: jako inhibitor kompetycyjny miejsca Q_o osłabia nasycanie łańcucha b elektronami przyczyniając się w ten sposób do zmniejszenia szybkości produkcji rodników, ale też jako substrat dla powstającego semichinonu przyczynia się do wzrostu szybkości produkcji rodników [36].

Produkcja anionorodnika ponadtlenkowego przez cytochrom bc_1 zależy od pozycji ISP-HD [15,29]. W momencie powstawania SQ_o prawdopodobieństwo generowania ROS wzrasta wraz ze wzrostem odległości między ISP-HD, a miejscem Q_o . To zwiększenie produkcji anionorodnika ponadtlenkowego możliwe jest zarówno w reakcji *semiforward* (Ryc. 3B a, b) jak i reakcji *semireverse* (Ryc. 3B c, d). Ponieważ w tych reakcjach ISP-HD jest poza miejscem Q_o , tak naprawdę nie ma znaczenia, czy klaster [2Fe-2S] jest w formie utlenionej (Ryc. 3B b, d) czy w formie zredukowanej (Ryc. 3B a, c).

„Zwarcia” zabezpieczające przed produkcją rodników

Innym scenariuszem od przedstawionych wcześniej reakcji generowania ROS są reakcje, w których następuje tylko utrata energii pochodzącej od utleniania ubichinolu, tzw. zwarcia (ang. *short-circuit*) [27,28]. Reakcje te obniżają wydajność bifurkacji elektronów w miejscu Q_o , ale bez generowania anionorodnika ponadtlenkowego. W wyniku tych reakcji elektrony są praktycznie przekazywane tylko na łańcuch c, co prowadzi do utraty funkcji translokacji protonów, i w konsekwencji do zmniejszenia wydajności fosforylacji oksydacyjnej. Prawdopodobieństwo zajścia reakcji „zwarcia” jest większe, kiedy zablokowane jest działanie miejsca katalitycznego Q_i . Co ciekawe, zarówno w cytochromie bc_1 jak i cytochromie b_6f (enzymie będącym częścią łańcucha fotosyntetycznego) wyłączenie miejsca Q_i nie powoduje całkowitego zablokowania działania miejsca Q_o . Jednak tylko w przypadku cytochromu b_6f udział reakcji „zwarcia” jest na tyle duży, że pomimo zablokowania miejsca Q_i przepływ elektronów przez łańcuch fotosyntetyczny jest wystarczający aby podtrzymać wzrost komórek [37].

Reakcje „zwarcia” konkurują z reakcjami generowania ROS o elektron pochodzący z semichinonu powstałego w miejscu Q_o . Obecność ISP-HD w pozycji Q_o zwiększa prawdopodobieństwo zajścia „zwarcia”, i tym samym zmniejsza szansę reakcji semichinonu z tlenem. Natomiast odsunięcie się ISP-HD od miejsca Q_o zmniejsza szansę zajścia „zwarcia” na rzecz zwiększenia prawdopodobieństwa powstania anionorodnika ponadtlenkowego. Pomimo tego, że „zwarcia” powodują dyssypację energii, mogą być korzystne z punktu widzenia ochrony



Rycina 4. Zależność szybkości produkcji anionorodnika ponadtlenkowego od stanu redoks puli ubichinonu. Q oznacza całkowicie utlenioną pulę ubichinonu, QH_2 natomiast całkowicie zredukowaną pulę. Na zielono przedstawiony jest obszar, w którym wysokie stężenie ubichinonu powoduje zmniejszenie szybkości produkcji rodników poprzez hamowanie (ubichinon współzawodniczy z ubichinolem) miejsca katalitycznego Q_o . Na pomarańczowo przedstawiony jest obszar, w którym niskie stężenie ubichinonu zmniejsza produkcję rodników, ponieważ jest on substratem dla semichinonu powstającego w miejscu Q_o . Kreską przerywaną oznaczony jest optymalny stan redoks puli, przy której występuje maksimum szybkości produkcji ROS.

przed produkcją wolnych rodników. Zapobiegają one powstawaniu ROS zarówno w przypadku semichinonu powstałego w reakcji *semiforward* (Ryc. 3B f) jak i *semireverse* (Ryc. 3B h).

Istnieje jeszcze jedna reakcja „zwarcia” w której uczestniczy hem b_L . W tym przypadku ubichinol znajdujący się w miejscu Q_o oddaje elektron na utleniony klastrowy [2Fe-2S] i powstaje w tym miejscu katalitycznym semichinon (reakcja *semiforward*, Ryc. 3A b). Następnie zachodzi transfer elektronu z hemu b_L na SQ_o z wytworzeniem ubichinolu (Ryc. 3B i), przy czym dla tej reakcji nie ma znaczenia pozycja ISP-HD ani stan redoks klastra [2Fe-2S].

Inne reakcje zabezpieczające przed produkcją rodników

Niektóre reakcje zachodzące w miejscu Q_o można uznać za neutralne z energetycznego punktu widzenia. Ponadto poprzez „neutralizację” semichinonu, reakcje te zabezpieczają przed produkcją anionorodnika ponadtlenkowego. Taką reakcją jest transfer elektronu ze zredukowanego klastra [2Fe-2S] domeny ISP-HD znajdującej się w pozycji Q_o na semichinon SQ_o . Reakcja ta może zajść zarówno w przypadku gdy SQ_o powstał w reakcji *semiforward* (Ryc. 3B e) jak i w reakcji *semireverse* (Ryc. 3B g). Inną reakcją „neutralną” jest transfer elektronu z SQ_o powstałego w wyniku reakcji *semireverse* na utleniony hem b_L (Ryc. 3B j).

W przypadku, gdy przepływ elektronów przez łańcuchy kofaktorów jest niezaburzony i przy swobodnym

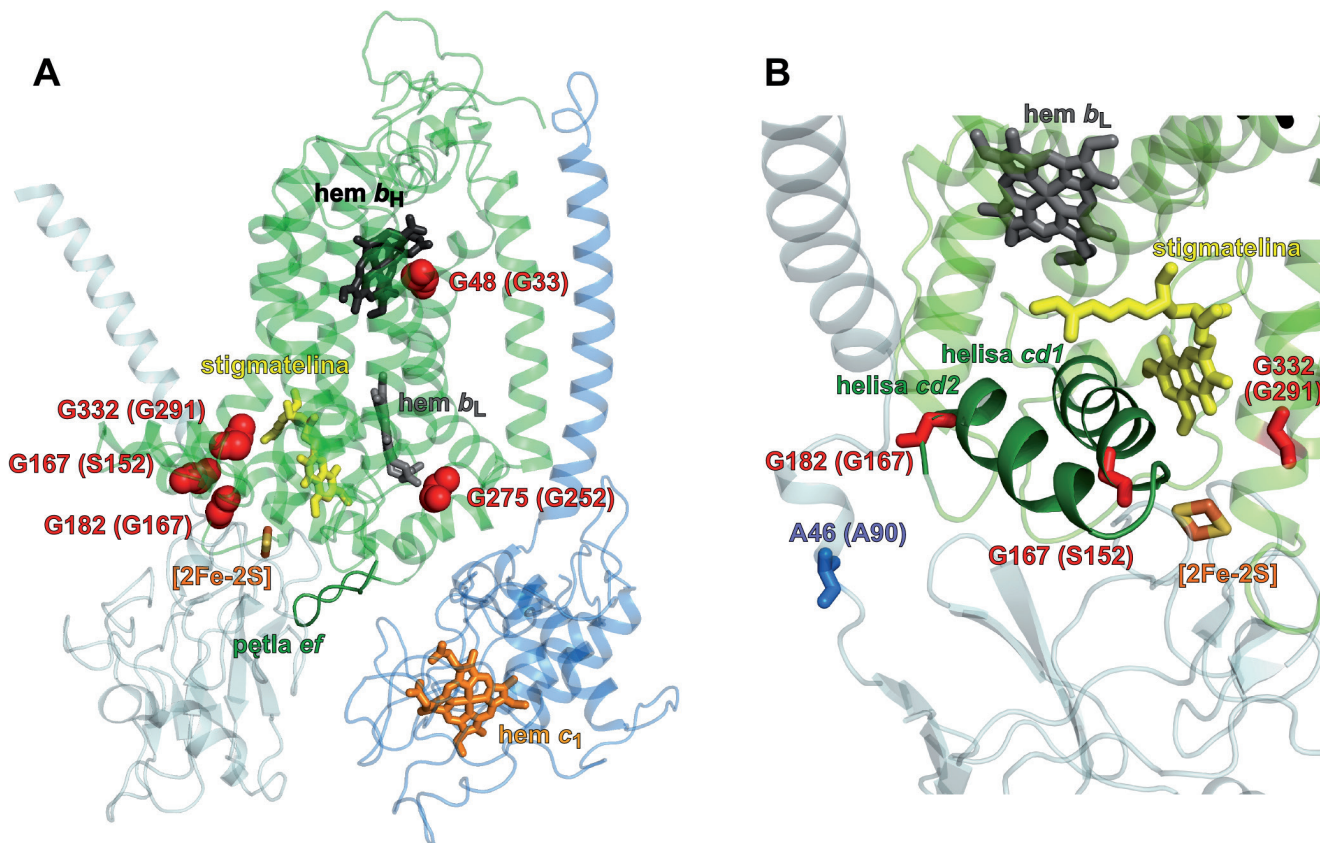
odpływie elektronów z miejsc katalitycznych, udział reakcji ubocznych w katalizie przeprowadzanej przez cytochrom bc_1 jest znikomy. Udział tych reakcji, w tym produkcji wolnych rodników, zależy prawdopodobnie od stanu oddychania komórkowego [38,39]. Wynika to z obserwacji, zgodnie z którymi czynniki zmniejszające szybkość oddychania komórkowego: wysoki potencjał błonowy, zablokowanie kompleksu V, wysoki stosunek $NADH:NAD^+$ lub hipoksja, sprzyjają powstawaniu anionorodnika ponadtlenkowego [38-42]. W tych warunkach wzrasta poziom redukcji kofaktorów w kompleksach łańcucha oddechowego, co zgodnie z mechanizmem uwzględniającym reakcje *semireverse* sprzyja powstawaniu semichinonu w miejscu Q_o , który w reakcji z tlenem tworzy anionorodnik ponadtlenkowy.

Reakcje uboczne w cytochromie bc_1 mogą zostać również wzmocnione podczas obecności inhibitora miejsca Q_o , antymycyny, [32,35,43,44] lub poprzez wprowadzenie mutacji punktowych, które zaburzają komunikację między miejscami katalitycznymi np. nokauty kofaktorów lub mutacje zmieniające ruch ISP-HD [15,29]. Przykładami takich mutacji mogą być również ludzkie mutacje mitochondrialne objawiające się w postaci różnych chorób takich jak nietolerancja wysiłku, miopatie, dysplazja przegrodowo-ocznna, retinopatia barwnikowa [45-48].

BADANIA EFEKTÓW MUTACJI MITOCHONDRIALNYCH W UKŁADACH MODELOWYCH

Ludzkie komórki zawierają zróżnicowaną ilość mitochondriów. Przeważnie ilość tych organelli wynosi około kilkaset, jednak może ona sięgać nawet kilku tysięcy w komórkach o dużym zapotrzebowaniu na energię (komórki wątroby, komórki mięśniowe, neurony). W każdym mitochondrium znajduje się kilka cząsteczek mtDNA, które mogą różnić się między sobą (zjawisko heteroplazmii). Dlatego mutacje w obrębie mtDNA mogą być mutacjami heteroplazmatycznymi (w obrębie populacji mtDNA występuje forma zawierająca zmutowany mtDNA i forma natywna) jak i homoplazmatycznymi (cała populacja mtDNA zawiera mutację). Przeważająca większość mutacji mitochondrialnych to mutacje heteroplazmatyczne. Ponieważ mitochondria rozdzielane są do komórek potomnych losowo, udział formy zmutowanej w komórkach potomnych może się zmieniać. Dlatego choroby mitochondrialne ujawniają się tylko w niektórych tkankach (zwłaszcza w tkankach o dużym zapotrzebowaniu energetycznym). Objawy chorób zależą od stosunku prawidłowego mtDNA do mtDNA niosącego mutację i pojawiają się po przekroczeniu pewnej wartości progowej.

Ze względu na ograniczoną ilość materiału do badań otrzymywanego od pacjentów i zjawiska heteroplazmii, efekty ludzkich mutacji mitochondrialnych najczęściej bada się w układach modelowych: modelu drożdżowym [46,47,49] i modelu bakteryjnym (purpurowe bakterie fotosyntetyzujące z rodzaju *Rhodobacter*) [15,36,50]. Cytochrom bc_1 jest białkiem konserwowanym ewolucyjnie, więc efekty molekularne mutacji opisanych dla bakteryj-



Rycina 5A. Struktura monomeru cytochromu bc_1 z *Rb. capsulatus* (Protein Data Bank: 1ZRT [64]) wraz z zaznaczonymi pozycjami mutacji mitochondrialnych omawianych w artykule. Pozycje mutacji wraz z numeracją (zgodną z sekwencją bakteryjnego cytochromu b , w nawiasach podano odpowiedniki tych mutacji w systemie drożdżowym) oznaczone są na czerwono. **B.** Zbliżenie na fragment struktury miejsca Q . Podjednostki cytochromu bc_1 oznaczone są kolorami: jasnoszarym – białko ISP, jasnozielonym – cytochrom b , jasnoniebieskim – cytochrom c_1 . Stigmatelina (inhibitor miejsca Q), oznaczona jest kolorem żółtym, hem c_1 – pomarańczowym, hem b_L – szarym, hem b_H – czarnym, helisy $cd1$ i $cd2$ – ciemnozielonym. Mutacje mitochondrialne oznaczone są jak na rycinie 5A, a miejsce insercji alaninowych, pozycja A46 (odpowiednik drożdżowej pozycji A90), kolorem niebieskim.

nego lub drożdżowego cytochromu b można odnieść do analogicznych mutacji w ludzkim mitochondrialnym cytochromie b .

Istnieją liczne przykłady badań ludzkich mutacji mitochondrialnych w systemie drożdżowym [46,47,49]. Najczęściej za główny efekt tych mutacji uznawano zaburzone składanie się kompleksu i obniżoną stabilność enzymu. Natomiast mutacje, które w niewielkim stopniu wpływały na składanie się białka, powodowały zmniejszenie aktywności enzymatycznej. Większość tych mutacji zaburza wzrost komórek drożdżowych wymagający metabolizmu tlenowego, co umożliwia uzyskanie rewertantów (nowych mutacji kompensujących efekt mutacji pierwotnej). Analiza rewertantów tego typu pomaga zrozumieć molekularny efekt mutacji mitochondrialnych.

Jeśli porównać stabilność cytochromu bc_1 z ludzkimi mutacjami mitochondrialnymi z ekwiwalentami tych mutacji na cytochromie b w innych systemach, to ludzki i drożdżowy cytochrom bc_1 wydają się być mniej stabilne od bakteryjnego [15,36,49,51,52]. Jest wysoce prawdopodobne, że mniejsza stabilność białka w tych układach jest wtórnym efektem mutacji mitochondrialnej. Badania tych mutacji w systemie bakteryjnym pozwalają wyjść poza ograniczenie związane z mniejszą stabilnością biał-

ka i umożliwiają poznanie przypuszczalnie pierwotnego efektu mutacji mitochondrialnych. Zaletą tego systemu jest sprzężenie działania cytochromu bc_1 z fotosyntetycznym centrum reakcji. Umożliwia to sprawdzanie w prosty sposób funkcjonalności różnych form cytochromu bc_1 *in vivo* poprzez obserwacje wzrostu fotosyntetycznego w warunkach beztlenowych. W tych warunkach bakterie *Rb. capsulatus* do podtrzymania wzrostu potrzebują sprawnie działającego cytochromu bc_1 [53]. System bakteryjny umożliwia również badanie kinetyki transferu elektronów w obrębie cytochromu bc_1 poprzez aktywację centrum reakcji błyskiem światła [54].

Inną metodą przydatną w badaniu molekularnych efektów mutacji w cytochromie bc_1 jest spektroskopia elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR) wykorzystująca obecność centrów paramagnetycznych. W oparciu o metodę impulsową EPR poprzez pomiary oddziaływania dipol-dipol między zredukowanym klastrem [2Fe-2S] a utlenionym hemem b_L możliwa jest analiza położenia tych centrów względem siebie, przy czym im mniejsze jest oddziaływanie dipol-dipol, tym bardziej oddalone są od siebie te centra [55].

Z licznych mutacji mitochondrialnych w cytochromie b wybraliśmy kilka, dla których poznanie efektów rzuca

światło nie tylko na etiologię chorób mitochondrialnych, ale także na molekularne mechanizmy działania cytochromu bc_1 (Ryc. 5).

MUTACJA MITOCHONDRIALNA T15197C (S151P) WPLYWA NA ODDZIAŁYWANIE CYTOCHROMU b Z ISP-HD - EFEKT STRUKTURALNY

Mutacja T15197C (numeracja sekwencji ludzkiego mtDNA) została znaleziona u pacjenta cierpiącego na nietolerancję wysiłku [51]. W sekwencji aminokwasowej skutkuje ona zamianą reszty seryny na resztę proliny w pozycji 151 (S151P). Pozycja ta znajduje się na helisie $cd1$ u wejścia ubichinolu do miejsca katalitycznego Q_o (Ryc. 5, pozycja G167 w *Rb. capsulatus*).

Badania biochemiczne tej mutacji u ludzi wykazały między innymi nieznacznie zmniejszoną ilość cytochromu b i cytochromu c_1 , oraz zmniejszoną aktywność enzymatyczną w porównaniu do WT [51]. Odpowiednikiem tej mutacji w systemie drożdżowym jest mutacja S152P (Ryc. 5). W modelu drożdżowym konsekwencją tej mutacji jest znaczny spadek ilości białka ISP i obniżenie aktywności enzymatycznej, które może być wynikiem substechiometrycznej ilości białka ISP [49]. Co ciekawe mutacjami supresorowymi dla mutacji S152P jest mutacja A90D znajdująca się w regionie zawiasowym białka ISP, w bliskim sąsiedztwie helisy $cd2$ cytochromu b (Ryc. 5B) [49].

W modelu bakteryjnym ekwiwalent tej mutacji mitochondrialnej, G167P (Ryc. 5), nie powoduje zmian w składzie podjednostkowym białka. Molekularnym efektem tej mutacji jest odsunięcie ISP-HD od miejsca Q_o (Ryc. 6) oraz znaczny spadek aktywności enzymatycznej, co czyni mutantą G167P niefunkcyjnym *in vivo* w warunkach fotosyntetycznych [15]. Spektroskopowym dowodem na odsunięcie ISP-HD od miejsca Q_o jest mniejsze, w porównaniu do formy WT, oddziaływanie dipolowe między hемом b_L a klastrem $[2Fe-2S]$ badane metodą impulsową EPR [15].

Odsunięcie ISP-HD od miejsca Q_o w mutancie G167P powoduje wzrost produkcji anionorodnika nadtlenkowego. Co ciekawe, odsunięcie to jest na tyle duże, że mutant G167P produkuje wolne rodniki nawet podczas nieobecności antymycyny. W tym mutancie zależność szybkości produkcji ROS od stanu redoks puli ubichinonu w kompleksie nie zablokowanym antymycyną przyjmuje charakterystyczny kształt krzywej dzwonowej (zgodnie z ogólnym profilem przedstawionym na Ryc. 4) z maksimum produkcji anionorodnika nadtlenkowego przypadającym na stan puli ubichinonu w około 70% zredukowanej [15], co jest zgodne z mechanizmem uwzględniającym reakcję *semireverse* powstawania SQ_o (Ryc. 3A c oraz 3B c, d), w którym substratem dla SQ_o jest ubichinon.

Istnieją formy cytochromu bc_1 , które w porównaniu do G167P wywierają przeciwny efekt na produkcję rodników. Ta supresja produkcji ROS pojawia się w mutantach 1Ala i 2Ala badanych w systemie bakteryjnym [29,30]. Są to mutacje, w których białko ISP w pozycji 46 (ekwi-

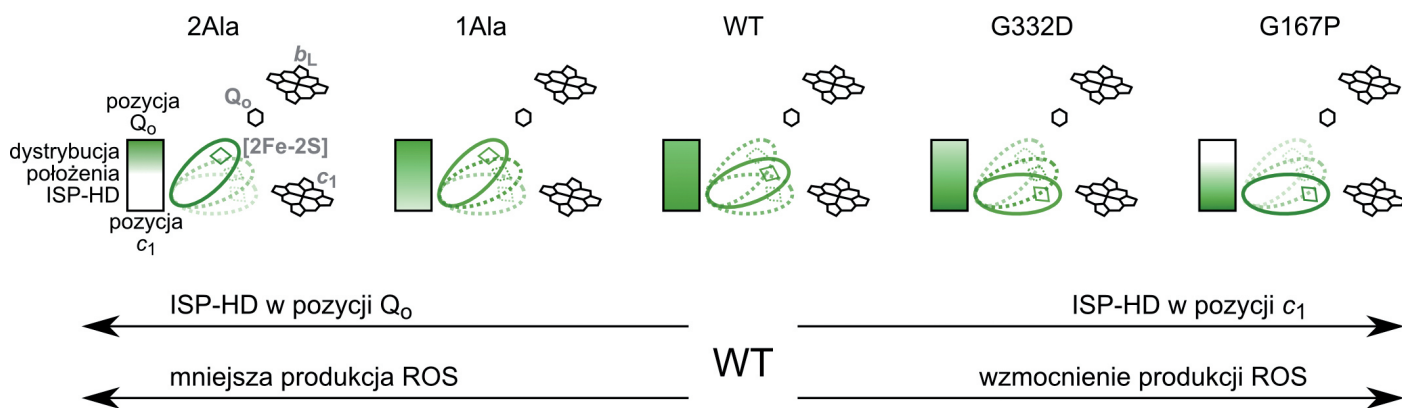
walent pozycji A90 w drożdżowym ISP) ma dodatkowo jedną (1Ala) lub dwie (2Ala) reszty alaniny (pozycja A46 oznaczona jest na Ryc. 5B) [10]. Efektem strukturalnym tych dodatkowych reszt aminokwasowych jest przysunięcie dystrybucji położenia ISP-HD w kierunku miejsca Q_o (pozycja Q_o) [30,55] i tym samym, zgodnie z mechanizmem produkcji ROS przez cytochrom bc_1 (Ryc. 3B e-h), zmniejszenie produkcji anionorodnika nadtlenkowego (Ryc. 6) [29,30]. Mutacja 2Ala powoduje „przytrzymanie” ISP-HD w pozycji Q_o na czas rzędu sekund, dlatego niemal cała populacja ISP-HD znajduje się w tej pozycji [10]. To przytrzymanie sprawia, że w mutancie 2Ala nie obserwuje się eksperymentalnie produkcji anionorodnika nadtlenkowego nawet podczas inhibicji kompleksu antymycyną [29]. Natomiast mutacja 1Ala prowadząca do „przytrzymania” ISP-HD w pozycji Q_o na czas rzędu milisekund [10], powoduje zmniejszenie produkcji rodników w porównaniu do formy natywnej [30], dla której czas przebywania ISP-HD w pozycji Q_o jest rzędu mikrosekund.

Porównując molekularne efekty mutacji G167P z 1Ala i 2Ala można przypuszczać, że mutacje alaninowe są dobrymi kandydatami na mutacje supresorowe dla G167P. Rzeczywiście, okazało się, że molekularny efekt podwójnych mutantów G167P/1Ala oraz G167P/2Ala jest wypadkową efektów pojedynczych form [15]. Równowagowe położenie ISP-HD w podwójnych mutantach G167P/1Ala i G167P/2Ala znajduje się między położeniami ISP-HD dla pojedynczych mutacji G167P i 1Ala oraz G167P i 2Ala. Ta zmiana położenia ISP-HD w podwójnym mutancie G167P/2Ala, w porównaniu do G167P, jest wystarczająca do zabezpieczenia przed produkcją ROS w warunkach braku inhibitora. Badanie zdolności mutantów podwójnych do wzrostu w warunkach fotosyntetycznych wykazało, że są one funkcjonalne *in vivo*. Co ciekawe, pojedyncze mutacje 2Ala i G167P czynią enzym niefunkcyjnym *in vivo*, natomiast kombinacja mutacji G167P oraz 2Ala przywraca zdolność wzrostu fotosyntetycznego.

Podobny efekt przywrócenia funkcjonalności *in vivo* zaobserwowano w układzie drożdżowym gdy w wyjściowym mutancie S152P pojawiła się rewersja A90D (w tej samej pozycji na białku ISP co mutacje 1Ala i 2Ala w *Rb. capsulatus*), co wyraźnie wskazuje na to, że mutacja ta wywiera wpływ na oddziaływanie między podjednostkami na powierzchni cytochrom b - ISP-HD [49].

MUTACJA MITOCHONDRIALNA G15615A (G290D) WPLYWA NA ODDZIAŁYWANIE CYTOCHROMU b Z ISP-HD - EFEKT ELEKTROSTATYCZNY

Mutacją o podobnym efekcie molekularnym jak opisana powyżej mutacja G167P jest mutacja G15243A zidentyfikowana u pacjenta cierpiącego na nietolerancję wysiłku [56]. Mutacja ta powoduje zamianę reszty glicyny w pozycji 290 na resztę kwasu asparaginowego. Pozycja 290 znajduje się na powierzchni oddziaływania cytochromu b z ISP-HD. Jest ona zlokalizowana na transbłonowej helisie F w pobliżu miejsca Q_o , oraz blisko ISP-HD będącego w pozycji Q_o (Ryc. 5, pozycja G332 w *Rb. capsulatus*).



Rycina 6. Schemat ilustrujący różnicę w dystrybucji położenia domeny ISP-HD w różnych mutantach w porównaniu do WT. W mutancie 2Ala średnia pozycja domeny ISP-HD jest przesunięta w kierunku miejsca Q_o . Obecność ISP-HD miejscu Q_o zabezpiecza przed produkcją ROS. Mutant G167P ma efekt przeciwny do mutantu 2Ala; w porównaniu do WT, średnia pozycja domeny ISP-HD jest odsunięta od miejsca Q_o . To odsunięcie powoduje wzmocnienie produkcji rodników. Efekt mutacji 1Ala i G332D jest pośredni. Zielony gradient w prostokątach reprezentuje zmiany gęstości ISP-HD.

Badania na mitochondriach izolowanych z komórek mięśniowych wykazały obniżoną aktywność enzymatyczną oraz obniżoną ilość niektórych podjednostek, między innymi cytochromu b i białka ISP, podczas gdy ilość cytochromu c_1 była normalna. Takie same obserwacje opisano dla G291D (Ryc. 5), analogicznej mutacji w drożdżach [52,57,58]. Ponadto w systemie drożdżowym mutant G291D nie był w stanie podtrzymać wzrostu komórkowego wymagającego metabolizmu tlenowego [49]. Interesujące jest to, że w układzie drożdżowym występują liczne rewersje mutacji G291D. Są to mutacje, tak jak w przypadku mutacji S152P, w obrębie regionu zawiasowego białka ISP (V88A/G/D, A90T/D) [49]. Występowanie rewersji w tym samym obszarze drożdżowego kompleksu sugeruje podobny pierwotny molekularny efekt mutacji mitochondrialnych S151P oraz G290D. Oprócz rewersji w obrębie białka ISP, zidentyfikowano również mutację w obrębie cytochromu b , D287H, znajdująca się tylko 3 Å od mutacji G291D [49]. Zmiana kwasu asparaginowego obdarzonego ładunkiem ujemnym na dodatnią histydynę prawdopodobnie neutralizuje ładunek ujemny wprowadzony w pozycji 291 i przywraca funkcjonalność kompleksu. Jest to wskazówką, że efekty mutacji G291D mają charakter elektrostatyczny.

W systemie bakteryjnym ekwiwalent mutacji mitochondrialnej G291D, mutacja G332D (Ryc. 5), nie powoduje zmian w składzie podjednostkowym białka [36]. Analiza wyników pomiaru oddziaływań dipolowych między hemem b_L a klastrem [2Fe-2S] badanych metodą impulsową EPR wykazała, że efekt odsunięcia ISP-HD od miejsca Q_o dla mutantu G332D jest pośredni między G167P a WT (Ryc. 6). W odróżnieniu do G167P, wpływ tego odsunięcia na wzrost poziomu produkcji ROS jest widoczny tylko w obecności antymycyny i jest on około dwukrotnie wyższy od poziomu produkcji ROS przez natywny kompleks. Ponadto, zaobserwowano, że kształt widma EPR klastra [2Fe-2S] oddziałującego z pulą ubichinonu zmienia się wraz ze wzrostem siły jonowej, co

wskazuje na elektrostatyczne pochodzenie odsunięcia ISP-HD od miejsca Q_o [36].

W podsumowaniu, mutanty, które zmieniają dystrybucję położenia ISP-HD można uszeregować w kolejności przedstawionej na rycinie 6 (po lewej stronie posiadające największą populację ISP-HD w pozycji Q_o i zmniejszające produkcję rodników, po prawej stronie posiadające najmniejszą populację ISP-HD w pozycji Q_o i wzmacniające produkcję ROS).

MUTACJA MITOCHONDRIALNA G14846A (G34S) – EFEKT STRUKTURALNY NA DUŻĄ ODLEGŁOŚĆ

Mutacją chorobotwórczą zlokalizowaną w innym miejscu na cytochromie b niż mutacje opisane powyżej jest G34S. Znajduje się ona pomiędzy miejscem katalitycznym Q_i i hemem b_H i dlatego może wywierać wpływ na oba te miejsca (Ryc. 5, pozycja G48 w *Rb. capsulatus*). Mutacja ta została zidentyfikowana u 52-letniej kobiety, która od dziecka wykazywała nietolerancję wysiłku nie tylko podczas ćwiczeń fizycznych czy chodzenia, ale nawet podczas czynności takich jak jedzenie [59]. U pacjentki wykryto także zwiększone stężenie kwasu mlekowego we krwi, a badanie elektromiograficzne potwierdziło łagodną miopatię. Mutacja G34S pojawiła się u pacjentki *de novo*, gdyż objawów tych nie stwierdzono u jej matki.

W celu zbadania molekularnych efektów mutacji G34S na działanie kompleksu III jej odpowiednik został wprowadzony do mitochondriów drożdży *Saccharomyces cerevisiae* jako mutacja G33S (Ryc. 5A) [49]. Tak zmutowane kompleksy nie były w stanie podtrzymać wzrostu drożdży na medium wymagającym metabolizmu tlenowego. Aktywność katalityczna zmutowanego kompleksu była około ośmiokrotnie niższa niż w przypadku natywnego kompleksu bc_1 . Analiza biochemiczna wykazała, że skład podjednostkowy kompleksu z mutacją G33S jest inny niż kompleksu typu dzikiego i zawierał mniejszą ilość cytochromu b oraz białka ISP w stosunku do innych podjednostek. Ta ostatnia obserwacja jest o tyle zaskakująca, że umiejscowienie mutacji w pobliżu miejsca Q_i nie po-

winno raczej mieć wpływu na interakcję cytochromu *b* z białkiem ISP. Autorzy sugerują że mutacja reszty glicyny w pozycji 33 na resztę seryny w sposób niebezpośredni powoduje zmiany strukturalne na daleką odległość [49]. Podobny efekt na daleką odległość obserwowany dla antymycyny związanej w miejscu Q_i powiązany był z odsunięciem ISP-HD od miejsca Q_o [55]. Zmierzone widma optyczne hemów w tym kompleksie również różniły się od widm białka natywnego. Sugeruje to, że mutacja G33S poprzez zmianę środowiska aminokwasowego wokół hemu h_H może również lokalnie wpływać na strukturę białka. Ekwiwalent tej mutacji mitochondrialnej w systemie bakteryjnym, G48S (Ryc. 5A), jest obecnie badany.

PODSUMOWANIE

Przyglądając się budowie i mechanizmowi działania cytochromu bc_1 , jak i efektom badanych dotychczas mutacji punktowych w obrębie enzymu można zaproponować, że ruch białka ISP jest elementem stosunkowo łatwo podatnym na modyfikacje, które w szeregu przypadków modulują aktywność enzymu przy zachowaniu jego ogólnej funkcjonalności. Istotnie dla niektórych chorobotwórczych mutacji mitochondrialnych pierwotnym, molekularnym efektem okazuje się być przesunięcie dystrybucji położenia ISP-HD w kierunku cytochromu c_1 . Efekt ten przypisany został mutacjom G167P (S151P u ludzi) i G332D (G290D u ludzi) badanym w modelu bakteryjnym. Następstwem tego przesunięcia może być mniejsza stabilność enzymu wykazana dla analogicznych mutacji wprowadzonych w systemie drożdżowym (S152P i G291D), która przejawia się zaburzeniem w składzie podjednostkowym, brakiem między innymi białka ISP.

Korelację między odsunięciem ISP-HD w mutacjach mitochondrialnych a mniejszą stabilnością można uzasadnić obserwacją, zgodnie z którą inhibitor miejsca Q_i , antymycyna, która przesuwa dystrybucję ISP-HD w kierunku cytochromu c_1 , powoduje większą podatność ISP-HD na cięcie proteolityczne [60]. Natomiast mutacje oraz inhibitory, które przesuwały ISP-HD w odwrotnym kierunku chronią kompleks przed proteolizą [10,60].

Oprócz zmniejszonej aktywności enzymatycznej, następstwem odsunięcia ISP-HD jest większa produkcja rodników. W modelu bakteryjnym, dla mutantów G167P i G332D poziom produkcji anionorodnika ponadtlenkowego generowanego w obecności antymycyny jest blisko dwa razy większy niż w formie natywnej. Dodatkowo, odsunięcie domeny ISP-HD w mutancie G167P jest na tyle duże, że produkuje on wolne rodniki nawet bez antymycyny. Profil zależności szybkości produkcji anionorodnika ponadtlenkowego przez niezablokowany inhibitorem G167P jest zgodny z modelem powstawania semichinonu w reakcji *semireverse* (Ryc. 4).

Przypuszczalnie, inne mutacje mitochondrialne znajdujące się w pobliżu miejsca Q_o mogą mieć efekt molekularny podobny do efektu mutacji S151P i G290D. Przykładami takich mutacji mogą być G166E [61] (G167E w drożdżach, G182E w *Rb. capsulatus* (Ryc. 5)) i G251D [62] (G252D w drożdżach, G275D w *Rb. capsulatus* (Ryc. 5)),

które w badaniach w systemie drożdżowym wykazywały dużą niestabilność. Muteina G167E wykazywała niestabilność w czasie przebiegu reakcji enzymatycznej [63], natomiast muteina G252D wykazywała niestabilność manifestującą się w obniżeniu aktywności enzymu podczas oczyszczania białka [49]. Prawdopodobnie przyczyną tej niestabilności może być odsunięcie równowagowego położenia ISP-HD od miejsca Q_o . Podobny efekt odsunięcia można prawdopodobnie przypisać mutacji G34S. Wskazówką na to są badania w systemie drożdżowym, gdzie wykazano mniejszą stabilność białka i zasugerowano możliwość wystąpienia oddziaływań na dalekie odległości między miejscem Q_i a powierzchnią oddziaływania cytochrom *b* - ISP-HD.

Przedstawione powyżej przykłady uwidaczniają, że badanie mutacji mitochondrialnych w cytochromie *b* w układach modelowych może z jednej strony przyczynić się do wyjaśnienia podłoża molekularnego chorób mitochondrialnych, z drugiej zaś strony może pomóc w zrozumieniu mechanizmu reakcji katalitycznych i warunków występowania reakcji ubocznych. Dwa systemy używane w tych badaniach (bakteryjny i drożdżowy) wzajemnie się uzupełniają dając pełniejszy obraz efektów molekularnych tych mutacji.


PIŚMIENNICTWO

- Mitchell P (1975) The protonmotive Q cycle: A general formulation. *FEBS Lett* 59: 137-139
- Crofts AR, Meinhardt SW, Jones KR, Snozzi M (1983) The role of the quinone pool in the cyclic electron-transfer chain of *Rhodospseudomonas sphaeroides*: A modified Q-cycle mechanism. *Biochim Biophys Acta* 723: 202-218
- 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
- Mitchell P (1976) Possible molecular mechanisms of the protonmotive function of cytochrome systems. *J Theor Biol* 62: 327-367
- Kim H, Xia D, Yu CA, Xia JZ, Kachurin AM, Zhang L, Yu L, Deisenhofer J (1998) Inhibitor binding changes domain mobility in the iron-sulfur protein of the mitochondrial bc_1 complex from bovine heart. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 8026-8033
- 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
- Zhang Z, Huang L, Shulmeister VM, Chi YI, Kim KK, Hung LW, Crofts AR, Berry EA, Kim SH (1998) Electron transfer by domain movement in cytochrome bc_1 . *Nature* 392: 677-684
- Xia D, Yu CA, Kim H, Xia JZ, Kachurin AM, Zhang L, Yu L, Deisenhofer J (1997) Crystal structure of the cytochrome bc_1 complex from bovine heart mitochondria. *Science* 277: 60-66
- Darrrouzet E, Valkova-Valchanova M, Daldal F (2000) Probing the role of the Fe-S subunit hinge region during Q_o site catalysis in *Rhodobacter capsulatus* bc_1 complex. *Biochemistry* 39: 15475-15483
- Darrrouzet E, Valkova-Valchanova M, Moser CC, Dutton PL, Daldal F (2000) Uncovering the 2Fe2S₂ domain movement in cytochrome bc_1 and its implications for energy conversion. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 4567-4572
- Darrrouzet 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
- Darrrouzet E, Daldal F (2003) Protein-protein interactions between cytochrome *b* and the Fe-S protein subunits during QH₂ oxidation and


- large-scale domain movement in the bc_1 complex. *Biochemistry* 42: 1499-1507
13. Rajagukguk S, Yang S, Yu C-A, Yu L, Durham B, Millett F (2007) Effect of mutations in the cytochrome *b_{ef}* loop on the electron-transfer reactions of the Rieske iron-sulfur protein in the cytochrome bc_1 complex. *Biochemistry* 46: 1791-1798
 14. 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
 15. 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
 16. Castellani M, Covian R, Kleinschroth T, Anderka O, Ludwig B, Trumppower BL (2010) Direct demonstration of half-of-the-sites reactivity in the dimeric cytochrome bc_1 complex. *J Biol Chem* 285: 502-510
 17. 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
 18. Lanciano P, Lee DW, Yang H, Darrouzet E, Daldal F (2011) Intermonomer electron transfer between the low-potential *b* hemes of cytochrome bc_1 . *Biochemistry* 50: 1651-1663
 19. Lanciano P, Khalfaoui-Hassani B, Selamoglu N, Daldal F (2013) Intermonomer electron transfer between the *b* hemes of heterodimeric cytochrome bc_1 . *Biochemistry* 52: 7196-7206
 20. Czaplą 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
 21. Ekiert R, Czaplą M, Sarewicz M, Osyczka A (2014) Hybrid fusions show that inter-monomer electron transfer robustly supports cytochrome bc_1 function *in vivo*. *Biochem Biophys Res Commun* 451: 270-275
 22. Czaplą 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
 23. Pintscher S, Kuleta P, Bujnowicz L, Sarewicz M, Osyczka A (2014) Molekularny mechanizm reakcji katalitycznych i produkcji wolnych rodników przez cytochrom bc_1 . *Postępy Biochem* 60: 285-294
 24. Shinkarev VP, Wraight CA (2007) Intermonomer electron transfer in the bc_1 complex dimer is controlled by the energized state and by impaired electron transfer between low and high potential hemes. *FEBS Lett* 581: 1535-1541
 25. Covian R, Trumppower BL (2005) Rapid electron transfer between monomers when the cytochrome bc_1 complex dimer is reduced through center N. *J Biol Chem* 280: 22732-22740
 26. Hong S, Victoria D, Crofts AR (2012) Inter-monomer electron transfer is too slow to compete with monomeric turnover in bc_1 complex. *Biochim Biophys Acta* 1817: 1053-1062
 27. Osyczka A, Moser CC, Daldal F, Dutton PL (2004) Reversible redox energy coupling in electron transfer chains. *Nature* 427: 607-612
 28. Osyczka A, Moser CC, Dutton PL (2005) Fixing the Q cycle. *Trends Biochem Sci* 30: 176-182
 29. 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
 30. 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
 31. Cape JL, Bowman MK, Kramer DM (2006) Understanding the cytochrome *bc* complexes by what they don't do. The Q-cycle at 30. *Trends Plant Sci* 11: 46-55
 32. 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
 33. Kramer DM, Roberts AG, Muller F, Cape JL, Bowman MK (2004) Q-cycle bypass reactions at the Q_o site of the cytochrome bc_1 (and related) complexes. *Methods Enzymol* 382: 21-45
 34. Dröse S, Brandt U (2008) The mechanism of mitochondrial superoxide production by the cytochrome bc_1 complex. *J Biol Chem* 283: 21649-21654
 35. Quinlan CL, Gerencser AA, Treberg JR, Brand MD (2011) The mechanism of superoxide production by the antimycin-inhibited mitochondrial Q-cycle. *J Biol Chem* 286: 31361-31372
 36. 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
 37. Malnoë A, Wollman F-A, de Vitry C, Rappaport F (2011) Photosynthetic growth despite a broken Q-cycle. *Nat Commun* 2: 1-6
 38. Adam-Vizi V, Chinopoulos C (2006) Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species. *Trends Pharmacol Sci* 27: 639-645
 39. Murphy MP (2009) How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* 417: 1-13
 40. Guzy RD, Schumacker PT (2006) Oxygen sensing by mitochondria at complex III: the paradox of increased reactive oxygen species during hypoxia. *Exp Physiol* 91: 807-819
 41. Korshunov SS, Skulachev VP, Starkov AA (1997) High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett* 416: 15-18
 42. Solaini G, Baracca A, Lenaz G, Sgarbi G (2010) Hypoxia and mitochondrial oxidative metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1797: 1171-1177
 43. Boveris A, Cadenas E (1975) Mitochondrial production of superoxide anions and its relationship to the antimycin insensitive respiration. *FEBS Lett* 54: 311-314
 44. Ksenzenko M, Konstantinov AA, Khomutov GB, Tikhonov AN, Ruge EK (1983) Effect of electron transfer inhibitors on superoxide generation in the cytochrome bc_1 site of the mitochondrial respiratory chain. *FEBS Lett* 155: 19-24
 45. Bénit P, Lebon S, Rustin P (2009) Respiratory-chain diseases related to complex III deficiency. *Biochim Biophys Acta* 1793: 181-185
 46. Fisher N, Meunier B (2001) Effects of mutations in mitochondrial cytochrome *b* in yeast and man. Deficiency, compensation and disease. *Eur J Biochem* 268: 1155-1162
 47. Meunier B, Fisher N, Ransac S, Mazat JP, Brasseur G (2013) Respiratory complex III dysfunction in humans and the use of yeast as a model organism to study mitochondrial myopathy and associated diseases. *Biochim Biophys Acta* 1827: 1346-1361
 48. DiMauro S (2004) Mitochondrial diseases. *Biochim Biophys Acta* 1658: 80-88
 49. Fisher N, Castleden CK, Bourges I, Brasseur G, Dujardin G, Meunier B (2004) Human disease-related mutations in cytochrome *b* studied in yeast. *J Biol Chem* 279: 12951-12958
 50. Lee D-W, Selamoglu N, Lanciano P, Cooley JW, Forquer I, Kramer DM, Daldal F (2011) Loss of a conserved tyrosine residue of cytochrome *b* induces reactive oxygen species production by cytochrome bc_1 . *J Biol Chem* 286: 18139-18148
 51. Legros F, Chatzoglou E, Frachon P, Ogier De Baulny H, Laforêt P, Jardel C, Godinot C, Lombès A (2001) Functional characterization of novel mutations in the human cytochrome *b* gene. *Eur J Hum Genet* 9: 510-518
 52. Bouzidi MF, Schägger H, Collombet JM, Carrier H, Flocard F, Quard S, Mousson B, Godinot C (1993) Decreased expression of ubiquinol-cytochrome *c* reductase subunits in patients exhibiting mitochondrial

- myopathy with progressive exercise intolerance. *Neuromuscul Disord* 3: 599-604
53. Czapla M, Borek A, Sarewicz M, Osyczka A (2012) Fusing two cytochromes *b* of *Rhodobacter capsulatus* cytochrome *bc*₁ using various linkers defines a set of protein templates for asymmetric mutagenesis. *Protein Eng Des Sel* 25: 15-25
 54. Cieluch E, Pietryga K, Sarewicz M, Osyczka A (2010) Visualizing changes in electron distribution in coupled chains of cytochrome *bc*₁ by modifying barrier for electron transfer between the FeS cluster and heme *c*₁. *Biochim Biophys Acta* 1797: 296-303
 55. 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
 56. Dumoulin R, Sagnol I, Ferlin T, Bozon D, Stepien G, Mousson B (1996) A novel gly290asp mitochondrial cytochrome *b* mutation linked to a complex III deficiency in progressive exercise intolerance. *Mol Cell Probes* 10: 389-391
 57. Bouzidi MF, Carrier H, Godinot C (1996) Antimycin resistance and ubiquinol cytochrome *c* reductase instability associated with a human cytochrome *b* mutation. *Biochim Biophys Acta* 1317: 199-209
 58. Mousson B, Collombet JM, Dumoulin R, Carrier H, Flocard F, Bouzidi M, Godinot C, Maire I, Mathieu M, Quard S (1995) An abnormal exercise test response revealing a respiratory chain complex III deficiency. *Acta Neurol Scand* 91: 488-493
 59. Andreu AL, Hanna MG, Reichmann H, Bruno C, Penn AS, Tanji K, Pallotti F, Iwata S, Bonilla E, Lach B, Morgan-Hughes J, DiMauro S (1999) Exercise intolerance due to mutations in the cytochrome *b* gene of mitochondrial DNA. *N Engl J Med* 341: 1037-1044
 60. Valkova-Valchanova M, Darrouzet E, Moomaw CR, Slaughter CA, Daldal F (2000) Proteolytic cleavage of the Fe-S subunit hinge region of *Rhodobacter capsulatus* *bc*₁ complex: effects of inhibitors and mutations. *Biochemistry* 39: 15484-15492
 61. Valnot I, Kassir J, Chretien D, de Lonlay P, Parfait B, Munnich A, Kachaner J, Rustin P, Rötig A (1999) A mitochondrial cytochrome *b* mutation but no mutations of nuclearly encoded subunits in ubiquinol cytochrome *c* reductase (complex III) deficiency. *Hum Genet* 104: 460-466
 62. Andreu AL, Checcarelli N, Iwata S, Shanske S, DiMauro S (2000) A missense mutation in the mitochondrial cytochrome *b* gene in a revisited case with histiocytoid cardiomyopathy. *Pediatr Res* 48: 311-314
 63. Fisher N, Bourges I, Hill P, Brasseur G, Meunier B (2004) Disruption of the interaction between the Rieske iron-sulfur protein and cytochrome *b* in the yeast *bc*₁ complex owing to a human disease-associated mutation within cytochrome *b*. *Eur J Biochem* 271: 1292-1298
 64. Berry EA, Huang L-S, Saechao LK, Pon NG, Valkova-Valchanova M, Daldal F (2004) X-Ray structure of *Rhodobacter capsulatus* cytochrome *bc*₁: comparison with its mitochondrial and chloroplast counterparts. *Photosynth Res* 81: 251-275

Molecular effects of mitochondrial mutations in cytochrome *b* of complex III and their impact on the levels of free radical production

Arkadiusz Borek, Robert Ekiert, Artur Osyczka 

Department of Molecular Biophysics; Faculty of Biochemistry, Biophysics and Biotechnology; Jagiellonian University; 7 Gronostajowa St., 30-387 Kraków, Poland

 e-mail: artur.osyczka@uj.edu.pl

Key words: cytochrome *b*, mitochondrial complex III, mitochondrial mutations, domain movement, ROS, superoxide radical

ABSTRACT

Cytochrome *bc*₁ (mitochondrial complex III) is a common element of several bioenergetic systems. This enzyme catalyses electron transfer from ubiquinol to cytochrome *c* coupled to translocation of protons across the membrane, which contributes to generation of protonmotive force utilized for ATP production. Cytochrome *b*, together with cytochrome *c*₁ and iron-sulfur protein (ISP), forms the evolutionarily conserved catalytic core. Transfer of electrons within this enzyme, is facilitated by the movement of ISP domain that allows communication between cytochrome *b* and cytochrome *c*₁. Mutations in the subunits of catalytic core may cause mitochondrial diseases, however elucidation of their molecular effects in human cells is difficult. For that reason yeast or bacterial systems are used. It was found that some mutations in cytochrome *b* influence the movement of ISP and, in consequence, the levels of superoxide generation. By exploring the effects of mitochondrial mutations in model systems one can not only learn about molecular basis of diseases but also gain insights about catalytic and side reactions in cytochrome *bc*₁.