

# Nietypowy semichinon jako element buforujący przepływ elektronów przez cytochromy z rodziny bc

## STRESZCZENIE

Cytochrom  $bc_1$  obecny w układach oddechowych, wraz z cytochromem  $b_f$  obecny w roślinnych układach fotosyntetycznych, tworzą rodzinę kompleksów  $bc$ . Główną rolą tych enzymów jest budowanie siły protonomotorycznej w poprzek błon bioenergetycznych dzięki sprzęgnięciu transllokacji protonów z transferem elektronów z puli rozpuszczalnych w błonie pochodnych chinonów na pulę białkowych przenośników elektronów. Mimo wielu lat badań nie jest w pełni znany mechanizm utlenienia pochodnych chinolu w miejscu  $Q_o$ . Zakłada się, że proces ten przebiega przez niestabilną formę częściowo utlenionego chinolu – semichinon, który może być substratem w ubocznej reakcji powstawania anionorodnika ponadtlenkowego. Semichinon ten pozostaje wciąż nieuchwytny eksperymentalnie. Zaobserwowano natomiast w miejscu  $Q_o$  metastabilną formę semichinonu sprzężoną magnetycznie ze zredukowanym klastrem żelazowo-siarkowym. Kłaster ten jest jednym z kofaktorów redoks w enzymach z rodziny  $bc$ . Wyniki eksperymentalne wskazują, że sprzężony z klastrem semichinon jest dodatkowym stanem w katalizie enzymu i może częściowo zapobiegać niepożądanym reakcjom ubocznym w miejscu  $Q_o$ , w tym produkcji anionorodnika ponadtlenkowego.

## ARCHITEKTURA UKŁADÓW BIOENERGETYCZNYCH

Uniwersalnym źródłem energii umożliwiającym wykonanie użytecznej pracy, bezpośrednio dostępnym dla organizmów żywych na poziomie molekularnym, jest hydroliza ATP do ADP i  $P_i$ . Większość ATP syntetyzowanego w komórkach powstaje w złożonych układach enzymatycznych osadzonych w wyspecjalizowanych błonach biologicznych (błonach bioenergetycznych). Układy te, w ogólnym przypadku, składają się z enzymów budujących siłę protonomotoryczną (gradient stężenia protonów w poprzek błony i elektrostatyczny potencjał błonowy) oraz syntazy ATP, enzymu wykorzystującego zgromadzoną w ten sposób energię do syntezy ATP. Zazwyczaj siłę protonomotoryczną zapewnia kilka enzymów połączonych funkcjonalnie ze sobą w tak zwany łańcuch transportu elektronów. Katalizują one dzięki aktywnym redokso-ko-faktorom (między innymi hemom, klastrom żelazowo-siarkowym, jonom metali i flawinom) szereg reakcji utleniania/redukcji sprzężonych z transllokacją protonów w poprzek błony.

W skład łańcuchów transportu elektronów (Ryc. 1) wchodzi: enzymy redukujące przenośniki elektronów dyfundujące w błonie (chinony), enzymy utleniające białkowe, rozpuszczalne w wodzie przenośniki elektronów oraz enzymy zapewniające przepływ elektronów pomiędzy tymi dwiema pulami przenośników. Rolę tych ostatnich pełnią zazwyczaj enzymy z rodziny kompleksów  $bc$ , w skład której wchodzi cytochrom  $bc_1$  (mitochondrialny kompleks III) i cytochrom  $b_f$  znajdujący się w układach fotosyntetycznych roślin i sinic. Choć w zarysie budowa i cykl katalityczny obu enzymów są podobne, to są między nimi pewne istotne różnice [1,2]. Substratami cytochromu  $bc_1$  są: ubichinol, ubichinon oraz cytochrom  $c$ , natomiast cytochromu  $b_f$  – plastochinol, plastochinon oraz plastocyanina. W strukturze cytochromu  $b_f$  znaleziono również dodatkowy kofaktor hemowy (hem  $c_i$ ) blisko miejsca redukcji chinonu ( $Q_i$ ), który nie występuje w cytochromie  $bc_1$ .

## CYKL KATALITYCZNY CYTOCHROMU $BC_1$

Dzięki  $\Delta G$  (zmianie energii swobodnej) wynikającej z różnicy potencjałów redoks między pulą ubichinolu w błonie, a pulą cytochromu  $c$  w przestrzeni międzybłonowej, cytochrom  $bc_1$  przyczynia się do budowania siły protonomotorycznej w poprzek błony, poprzez sprzężenie przepływu elektronów między pulami z transllokacją protonów.  $\Delta G$  jest przy tym dostatecznie duża, by umożliwić recyrkulację części elektronów z ubichinolu z powrotem do puli ubichinonu w celu zwiększenia wydajności łańcucha transportu elektronów


dr Łukasz Bujnowicz,

dr hab. Marcin Sarewicz,

prof. dr hab. Artur Osyczka 

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

[https://doi.org/10.18388/pb.2020\\_326](https://doi.org/10.18388/pb.2020_326)

 autor korespondujący:  
artur.osyczka@uj.edu.pl

**Słowa kluczowe:** semichinon, kłaster żelazowo-siarkowy, EPR, cytochrom  $bc_1$ , cytochrom  $b_f$ , anionorodnik ponadtlenkowy

**Wykaz skrótów:** ATP – adenozyntroójfosforan; DBH<sub>2</sub> – decylubichinol, EPR (ang. *Electron Paramagnetic Resonance*) – elektronowy rezonans paramagnetyczny; FeS – kłaster żelazowo-siarkowy Rieske’go [2Fe2S], O<sub>2</sub><sup>-</sup> – anionorodnik ponadtlenkowy; PQH<sub>2</sub> – decylplastochinol, Q<sub>o</sub> – miejsce utleniania chinolu, Q<sub>i</sub> – miejsce redukcji chinonu, SQ-FeS – semichinon w miejscu katalitycznym utleniania chinolu sprzężony oddziaływaniem wymiennym z FeS, WT (ang. *wild type*) – forma natywna białka

## ARTYKUŁ OPUBLIKOWANY W RAMACH

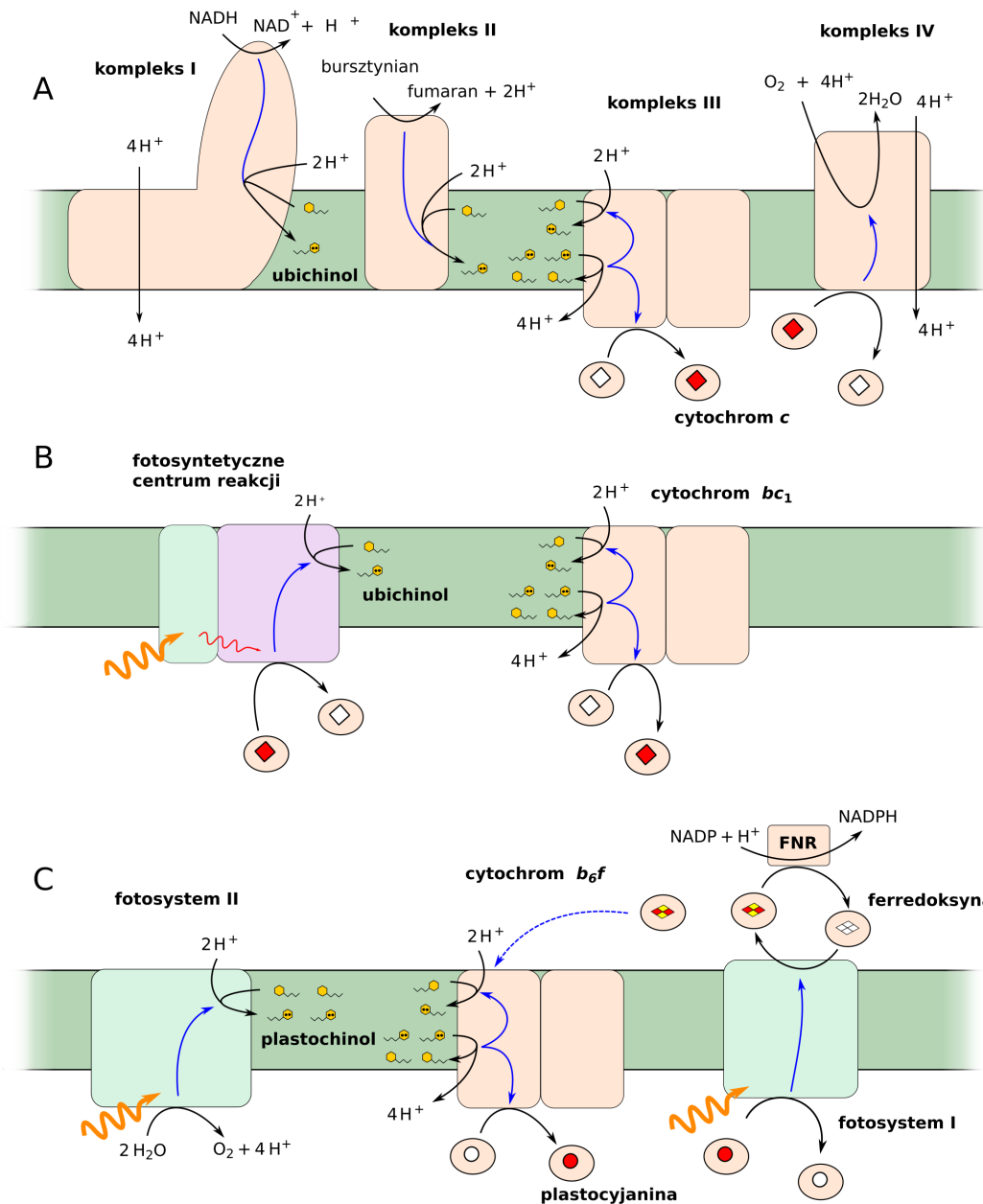
Nagrody Polskiego Towarzystwa Biochemicznego i firmy Merck Sp. z o.o.

za najlepszą pracę doktorską z biochemii im. Witolda Drabikowskiego w roku 2019

Laureat: dr Łukasz Bujnowicz

TYTUŁ ROZPRAWY: Semichinon sprzężony z klastrem żelazowo-siarkowym jako nowy element w mechanizmie działania i regulacji białek z rodziny cytochromów  $bc$

Promotor: prof. dr hab. Artur Osyczka

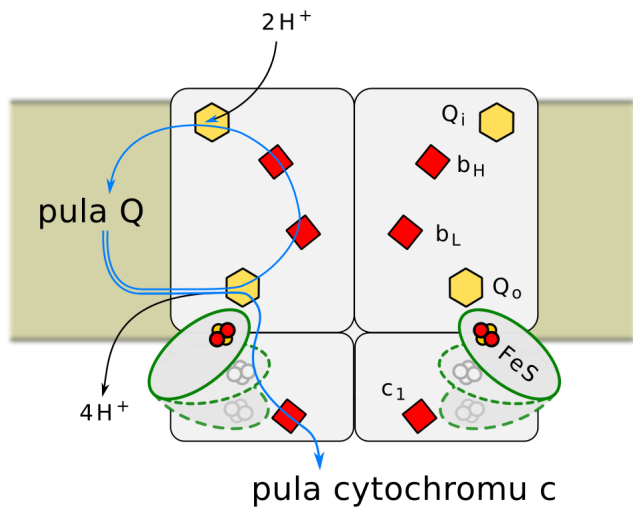


**Rycina 1.** Trzy łańcuchy transportu elektronów. Mitochondrialny oddechowy (A), fotosyntetyczny bakterii purpurowych *Rhodobacter capsulatus* (B) oraz fotosyntetyczny roślinny (C). Czarne strzałki oznaczają dyfuzję, niebieskie przepływ elektronów, niebieska przerywana strzałka symbolizuje przewidywany cykliczny transfer elektronów. Kolorem czerwonym oznaczono zredukowane kofaktory białek dyfuzyjnie przenoszących elektrony, białym kofaktory utlenione. Elektrony w ubi- oraz plastochinolach oznaczono dwiema czarnymi kropkami. Falującą strzałką oznaczono absorbowany kwant światła.

[3]. Recykulacja ta jest możliwa, gdyż enzym ten posiada trzy centra katalityczne: miejsce utleniania ubiquinolu zwane Q<sub>o</sub>, miejsce redukcji cytochromu c oraz miejsce redukcji ubiquinonu zwane Q<sub>i</sub>. W miejscu Q<sub>o</sub> znajdującym się blisko przestrzeni międzybłonowej, wraz z utlenieniem cząsteczki ubiquinolu następuje jej deprotonacja oraz rozwidlenie drogi elektronów (bifurkacja). Jedna ścieżka prowadzi przez kofaktory o wysokim potencjale redoks (klaster żelazowo-siarkowy Rieske'go [2Fe2S] oraz hem c<sub>1</sub>) do cytochromu c, druga przez kofaktory o niższym potencjale (hem b<sub>L</sub> i hem b<sub>H</sub>) do puli ubiquinonu (Ryc. 2). W miejscu Q<sub>i</sub> znajdującym się po przeciwnej stronie błony następuje redukcja ubiquinonu wraz z protonacją. W ten sposób, dzięki sprzężeniu

miejsca Q<sub>o</sub> oraz Q<sub>i</sub>, przebiega translokacja protonów w poprzek błony. Ponieważ jeden elektron z cząsteczki ubiquinolu trafia na cytochrom c, do pełnej redukcji ubiquinonu w miejscu Q<sub>i</sub> konieczne jest utlenienie dwóch cząsteczek ubiquinolu w miejscu Q<sub>o</sub> i tym samym zredukowanie dwóch cytochromów c. Opisany cykl utleniania chinolu i redukcji chinonu zwany jest cyklem Q.

Istotne jest to, że przeniesienie elektronu na hem c<sub>1</sub> wymaga ruchu domeny hydrofilowej białka żelazowo-siarkowego zawierającej klaster od pozycji bliskiej miejsca Q<sub>o</sub> do pozycji bliskiej hemowi c<sub>1</sub>. Ruch ten jest konieczny, gdyż zależne od odległości prawdopodobieństwo transferu elek-



**Rycina 2.** Uproszczony schemat cyklu katalitycznego cytochromu  $bc_1$ . Ze względu na przejrzystość rysunku przepływ elektronów przedstawiono tylko w jednym monomerze funkcjonalnego dimeru (schemat nie uwzględnia możliwego transferu elektronu między monomerami, który zachodzi między dwoma hemami  $b_L$ , [9]). Niebieskie ciągłe strzałki oznaczają drogę elektronów w czasie cyklu katalitycznego, czarne strzałki oznaczają pobór i uwolnienie protonów, kolorem czerwonym oznaczono kofaktory, żółtym miejsca wiązania chinolu lub chinonu. Przerywany zielony kontur symbolizuje ruch podjednostki z klastrem żelazowo-siarkowym.

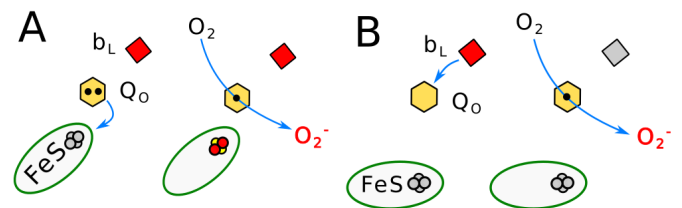
tronu z klastra na hem  $c_1$ , gdy klaster jest blisko miejsca  $QO$ , jest zbyt niskie, by pozwalało na podtrzymanie procesów fizjologicznych [4].

Pomimo wielu lat badań mechanizm bifurkacji nie jest w pełni poznany. Powszechnie panuje jednak pogląd, że stanem przejściowym utleniania chinolu w miejscu  $Q_O$  jest niestabilny rodnik semichinonowy, czyli połowicznie zredukowana forma chinonu.

W badaniach nad funkcjonowaniem cytochromów z rodziny  $bc$  istotnym zagadnieniem jest zrozumienie w jaki sposób enzymy te zapobiegają ubocznym reakcjom w miejscu  $Q_O$ , w tym tak zwanym „spięciem” (ang. *short circuit*). „Spięciami” zwane są wszystkie reakcje, które skutkują transferem obu elektronów z cząsteczki chinolu do cytochromu  $c$ . Reakcje te, choć preferowane z termodynamicznego punktu widzenia, powodowałyby dyssypację energii oraz utratę zdolności enzymu do generowania siły protonomotorycznej. Dotychczas zaproponowano kilka mechanizmów reakcji w miejscu  $Q_O$ , które mogą zabezpieczać przez „spięciami” [5–8]. Jednak pomimo znacznej ilości danych eksperymentalnych nie udało się rozstrzygnąć, czy modele te są prawdziwe. Inną potencjalnie niebezpieczną reakcją uboczną w miejscu  $Q_O$  jest powstawanie anionorodnika ponadtlenkowego, będącego reaktywną formą tlenu.

### PRODUKCJA ANIONORODNIKA PONADTLENKOWEGO PRZEZ CYTOCHROM $BC_1$

Cytochrom  $bc_1$ , w przypadku gdy odpływ elektronów przez gałąź niskopotencjałową jest utrudniony (np. z zainhibowanym antymycyną miejscem  $Q_i$ ), produkuje znaczące ilości anionorodnika ponadtlenkowego ( $O_2^-$ ) [10,11]. Za bezpośredni reduktor tlenu cząsteczkowego w reakcji powsta-

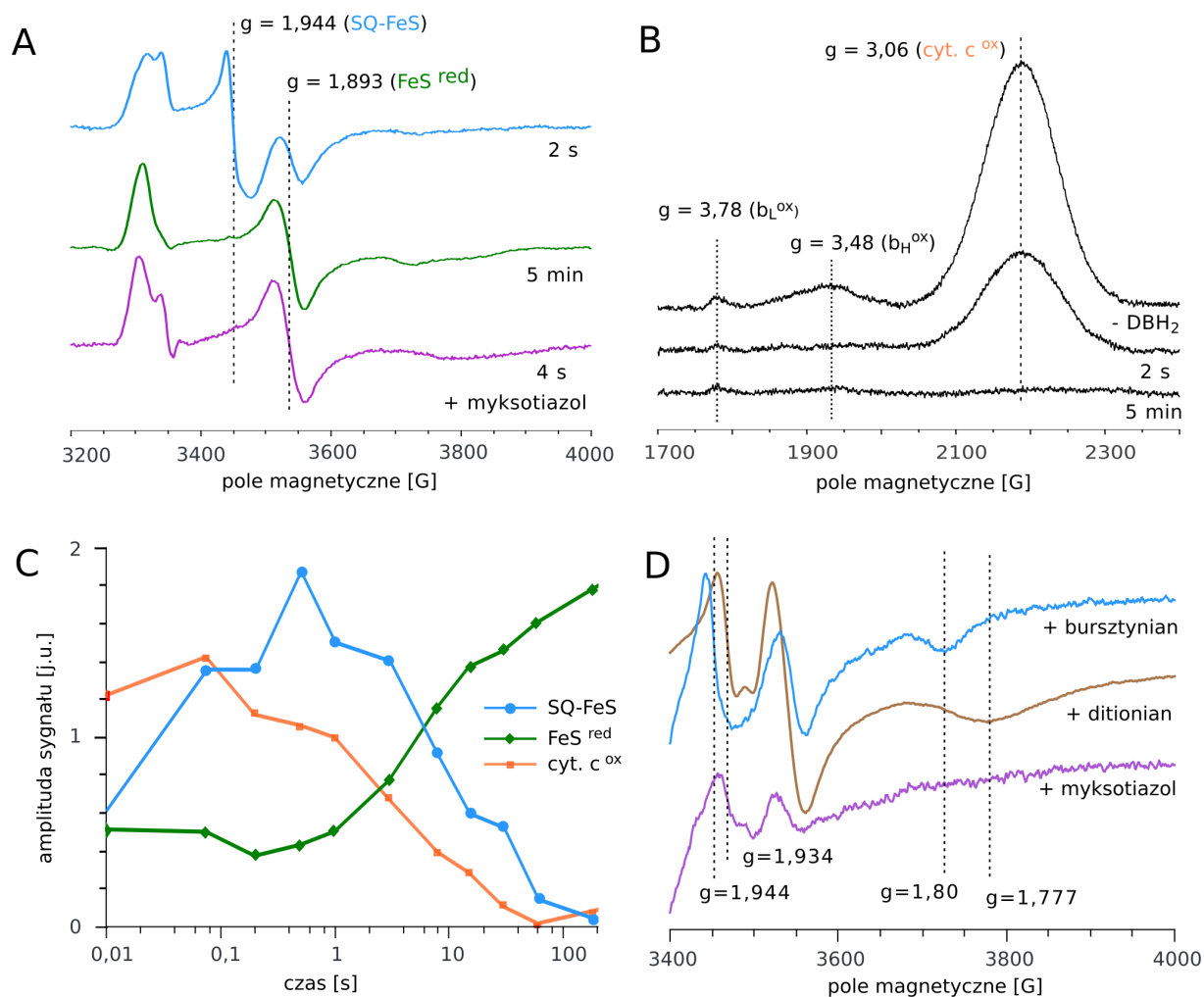


**Rycina 3.** Schemat produkcji anionorodnika ponadtlenkowego w reakcji częściowego utlenienia (A), oraz w reakcji częściowej redukcji (B). Kolorem czerwonym oznaczono kofaktory zredukowane, kolorem szarym kofaktory utlenione, elektrony na cząsteczce chinonu zaangażowane w reakcje oznaczono czarnymi kropkami, niebieskie strzałki oznaczają transfer elektronu.

wania  $O_2^-$  w cytochromie  $bc_1$  uważa się niestabilny semichinon w miejscu  $Q_O$ . Wynika to z faktu, że przewidywany potencjał pary redoks  $SQ/Q$  dla semichinonu w miejscu  $Q_O$  wynosi poniżej  $-400$  mV [5], natomiast potencjał pary  $O_2^-/O_2$  szacowany jest na około  $-160$  mV [12]. W niezainhibowanym enzymie semichinon powstaje również w miejscu  $Q_i$ . Jednakże dane eksperymentalne pokazują, iż rodnik ten jest stabilny i nie jest on zaangażowany w produkcję  $O_2^-$  [13,14]. Rozpatrywane są dwa scenariusze prowadzące do powstawania semichinonu w miejscu  $Q_O$ , przedstawione na rycinie 3. Pierwszy zwany reakcją częściowego utlenienia (ang. *semiforward*), drugi zwany reakcją częściowej redukcji (ang. *semireverse*) [10,11,15,16]. Częściowe utlenienie jest to bezpośrednie, jednoelektronowe utlenienie cząsteczki chinolu w miejscu  $Q_O$  przez klaster żelazowo-siarkowy do semichinonu, które ma miejsce w czasie katalizy enzymu. Jeśli „drugi” elektron pozostający na cząsteczce semichinonu nie może opuścić z jakiegos powodu miejsca  $Q_O$  (na przykład z powodu obecności w tym czasie zredukowanego hemu  $b_L$ ) rośnie prawdopodobieństwo reakcji semichinonu z tlenem cząsteczkowym i powstania  $O_2^-$  (Ryc. 3A).

W mechanizmie częściowej redukcji (Ryc. 3B) semichinon powstaje w wyniku jednoelektronowej redukcji cząsteczki chinonu w miejscu  $Q_O$  przez zredukowany hem  $b_L$ . Powstały w ten sposób semichinon może reagować z tlenem. Prawdopodobieństwo tej reakcji jest tym większe im bardziej hydrofilowa domena białka żelazowo-siarkowego jest oddalona od miejsca  $Q_O$  w momencie powstawania semichinonu. Mechanizm ten wymaga wcześniejszego etapu prowadzącego do redukcji hemu  $b_L$ , zazwyczaj reakcji utlenienia chinolu w miejscu  $Q_O$ . Część danych eksperymentalnych wskazuje, że bardziej prawdopodobne jest powstawanie anionorodnika poprzez mechanizm częściowej redukcji niż poprzez mechanizm częściowego utleniania [15,17]. Związek między położeniem ruchomej domeny białka żelazowo-siarkowego a prawdopodobieństwem generacji  $O_2^-$  jest postulowany w oparciu o wyniki badań, które pokazały, iż muteiny o zmienionej dystrybucji przestrzennej ruchomej domeny białka żelazowo-siarkowego wykazują różną produkcję  $O_2^-$ . Muteiny, w których domena zajmuje uśrednioną w czasie pozycję bliżej miejsca  $Q_O$  produkują mniej  $O_2^-$  niż muteiny z klastrem odsuniętym od miejsca  $Q_O$  względem typu dzikiego.

Znaczenie fizjologiczne produkcji  $O_2^-$  przez cytochrom  $bc_1$  nie jest do końca wyjaśnione [3]. Z jednej strony wiadomo, że reaktywne formy tlenu prowadzą do uszkodzeń



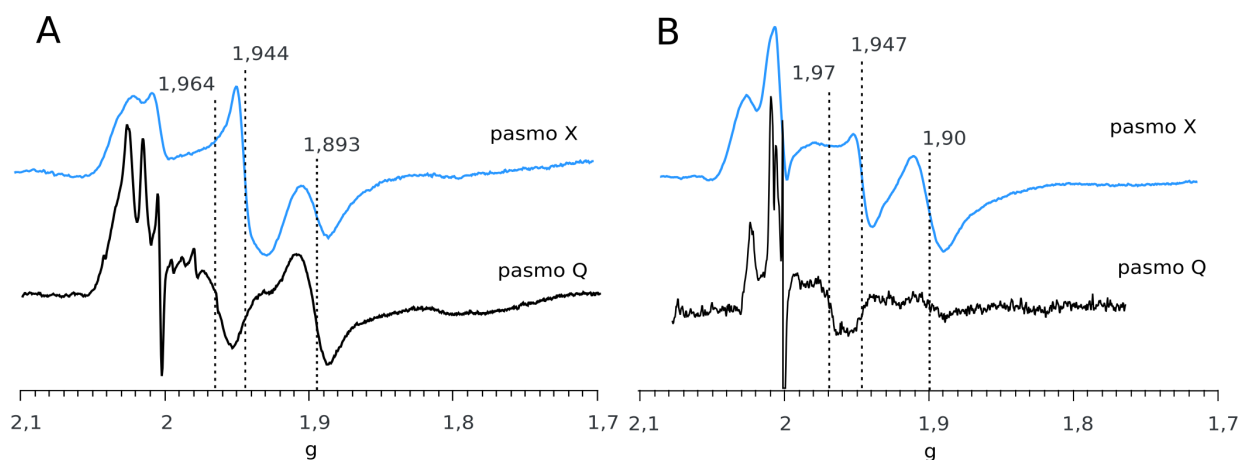
**Rycina 4.** Widma EPR cytochromu  $bc_1$  z zainhibowanym antymycyną miejscem  $Q_i$  zarejestrowane w 20 K w paśmie X. Panel A: widma zredukowanego klastra żelazowo-siarkowego (FeS) oraz stanu SQ-FeS w białku izolowanym. Widmo niebieskie – próbka zamrożona w stanie dalekim od równowagi (2 s po dodaniu substratu –  $DBH_2$ ), widmo zielone – próbka zamrożona po ustaleniu równowagi (5 min od dodania  $DBH_2$ ), widmo fioletowe – próbka zamrożona 4 s po dodaniu  $DBH_2$ , w której uprzednio miejsce  $Q_o$  zainhibowano myksotiazolem. Na widmach zaznaczono pozycję przejść odpowiadających stanowi SQ-FeS ( $g = 1,944$ ) i samemu FeS ( $g = 1,893$ ). Panel B: widma EPR utlenionych hemów  $b_L$  i  $b_H$  oraz cytochromu  $c$  zarejestrowane w 20 K dla tych samych próbek. Od góry: przed reakcją ( $-DBH_2$ ) oraz 2 s i 5 min po dodaniu  $DBH_2$ . Na widmach zaznaczono pozycje odpowiadające hemom  $b_L$  i  $b_H$  oraz hemowi  $c$  w cytochromie  $c$ . Panel C: zależność amplitudy poszczególnych sygnałów przedstawionych na (A) i (B) od czasu trwania reakcji przed zamrożeniem próbki. Oś czasu przedstawiona jest w skali logarytmicznej. Panel D: widma EPR błon bioenergetycznych *R. capsulatus* z dodatkiem antymycyny mierzone w 20 K w paśmie X. Próbkę były przygotowane w warunkach normalnego oświetlenia i w obecności tlenu. Widmo niebieskie – błony z dodatkiem bursztynianu sodu, widmo brązowe – próbka zredukowana chemicznie ditionianem sodu, widmo fioletowe – z bursztynianem sodu po uprzednim dodaniu myksotiazolu. Na widmach zaznaczono pozycje odpowiadające stanowi SQ-FeS, niskopotencjalowemu klastrowi żelazowo-siarkowemu spoza cytochromu  $b_L$  ( $g = 1,934$ ) oraz przejściu FeS z cytochromu  $bc_1$  czulemu na stan redoks puli Q. Pozycja  $g = 1,8$  – pula Q utleniona, pozycja  $g = 1,777$  – pula Q zredukowana.

w komórce [18], z drugiej strony pojawiła się propozycja, że  $O_2$  generowany w miejscu  $Q_o$ , może mieć znaczenie jako element sygnałowy biorącym udział w przekazywaniu informacji o warunkach w jakich operuje łańcuch transportu elektronów [19,20].

### SEMICHINON W MIEJSCU $Q_o$

Wieloletnie niepowodzenia w próbach zarejestrowania stanu przejściowego reakcji bifurkacji jakim powinien być semichinon w miejscu  $Q_o$ , doprowadziły do wniosku, że stan ten jest niestabilny. Detekcji próbowano dokonać przy użyciu spektroskopii elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR). Spektroskopia ta jest wybiórcza dla układów o wypadkowym niezerowym spinie elektronowym takich jak wolne rodniki organiczne (np. semichinony lub

znaczniki spinowe) czy część jonów metali przejściowych (np. jony żelaza, miedzi czy manganu). Choć pojawiło się kilka prac [21–24], w których prezentowano widmo EPR o współczynniku żyromagnetycznym  $g$  bliskim 2 oczekiwany dla semichinonu, to tylko w przypadku [24] właściwości sygnału nie pozostawiały wątpliwości, iż pochodził on z miejsca  $Q_o$ . Wskazywały na to wrażliwość na inhibitory miejsca  $Q_o$  oraz wyjątkowe właściwości fizyczne obserwowanego centrum paramagnetycznego takie jak: szybka relaksacja spinowa spowodowana bliskością kofaktorów metalicznych i anomalna zależność amplitudy sygnału EPR od temperatury (spadek amplitudy wraz ze spadkiem temperatury) [25]. Detekcji sygnału semichinonu dokonano w stosunkowo wysokiej temperaturze 200 K w porównaniu z wcześniejszymi próbami przeprowadzonymi w temperaturze około 77 K. Co ciekawe, w badaniach tych zaobserwo-



**Rycina 5.** Porównanie widm EPR cytochromu  $bc_1$  (A) oraz cytochromu  $bf$  (B) zarejestrowanych w 20 K w paśmie X i paśmie Q przedstawione w dziedzinie współczynnika  $g$ . Widma zarejestrowano dla próbek zamrożonych nie później niż 3 s po dodaniu  $DBH_2$  (w przypadku cytochromu  $bc_1$ ) albo  $PQH_2$  (w przypadku cytochromu  $bf$ ). Na widmach zaznaczono pozycję głównego przejścia stanu SQ-FeS oraz klastra żelazowo-siarkowego.

wano również czułe na inhibitory miejsca  $Q_o$  przejście EPR w pozycji  $g = 1,94$ .

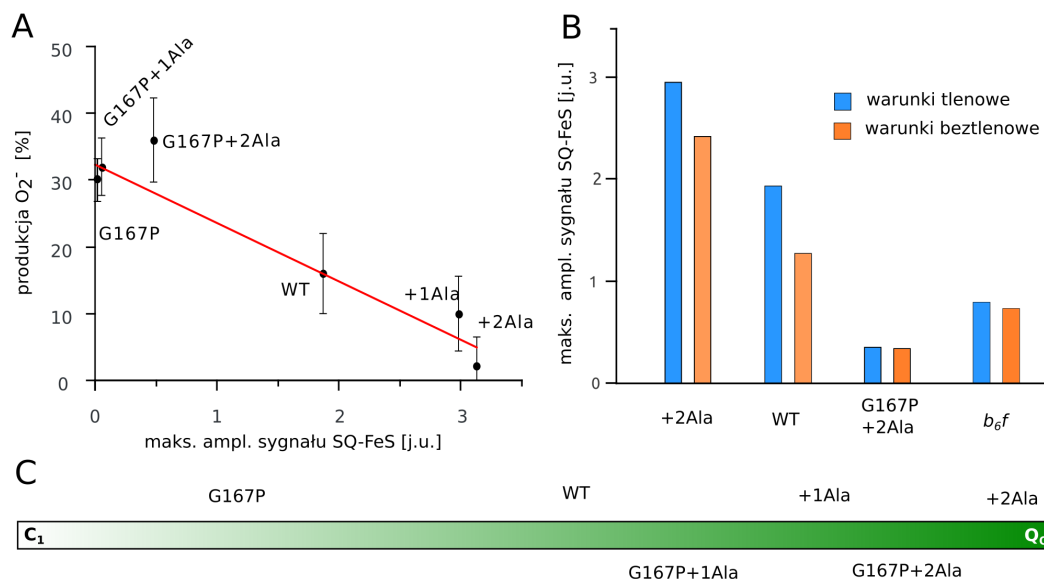
#### SEMICHION SPRZĘŻONY Z KLASTREM ŻELAZOWO-SIARKOWYM (SQ-FeS)

Odkryty sygnał EPR w pozycji  $g = 1,94$  pojawiał się w próbkach izolowanego cytochromu  $bc_1$  z zainhibowanym antymycyną miejscem  $Q_1$  w warunkach, w których były dla enzymu dostępne substraty: substytut naturalnego ubichinolu, decylubichinol ( $DBH_2$ ), i utleniony cytochrom  $c$ . W próbkach tych reakcja enzymatyczna była zatrzymywana poprzez szybkie zamrożenie roztworu (rozpylenie do schłodzonego izopentanu) po zaprogramowanym czasie od zmieszania reagentów (ang. *freeze-quick*). Następnie mierzono widma EPR przygotowanych próbek w temperaturze 200 K i 20 K. Na widmach EPR mierzonych w 20 K widoczne były sygnały zredukowanego klastra żelazowo-siarkowego (FeS), widmo utlenionego cytochromu  $c$ , widma utlenionych hemów  $b_L$  i  $b_H$  oraz nowy sygnał w pozycji  $g=1,94$  (Ryc. 4A i B). Amplituda tego sygnału osiągała maksimum po czasie od kilkuset milisekund do kilku sekund od zmieszania reagentów (Ryc. 4C). Sygnał ten widoczny był tak długo, jak długo utrzymywały się warunki nierównowagowe w próbce (pozostawała pula utlenionego cytochromu  $c$ , która mogła odebrać elektron z FeS oraz pula  $DBH_2$  mogąca dostarczyć elektronów). W tym czasie hem  $b_H$  był zredukowany, natomiast hem  $b_L$  pozostawał utleniony. Sygnał  $g=1,94$  nie pojawiał się, jeśli przed reakcją zainhibowano dodatkowo miejsce  $Q_o$  myksotiazolem (Ryc. 4A). Wrażliwość sygnału  $g=1,94$  na inhibitory miejsca  $Q_o$  (np. myksotiazol) oraz fakt, że sygnał pojawiał się jedynie wtedy, gdy w próbce panowały warunki nierównowagowe, jednoznacznie wskazywały na to, że sygnał jest związany z enzymatycznym utlenianiem chinolu. Na podstawie symulacji widm EPR zaproponowano, że nowy sygnał w pozycji  $g=1,94$  pochodzi od semichinonu w miejscu  $Q_o$ , który jest sprzężony spinowym oddziaływaniem wymiennym ze zredukowanym klastrem żelazowo-siarkowym (SQ-FeS). Dodatkowo stan redoks hemów  $b$  (utleniony hem  $b_L$  i zredukowany

hem  $b_H$ ) sugerował, że SQ-FeS powstawał w wyniku reakcji częściowej redukcji chinonu przez hem  $b_L$ .

Teoria opisująca spinowe oddziaływanie wymienne przewiduje, że pozycja oraz kształt przejścia EPR układu dwóch centrów paramagnetycznych, takich jak zredukowany klastrem żelazowo-siarkowy oraz semichinon, powinna zależeć od użytej w pomiarach częstotliwości mikrofal [26,27]. Kluczowe więc dla zweryfikowania przypuszczeń okazały się pomiary w paśmie Q, które to pasmo odpowiada wyższej częstotliwości mikrofal niż standardowo stosowane w biologicznych pomiarach EPR pasmo X. Wyniki pomiarów zgodziły się z przewidywaniami. Przejście EPR przypisywane do SQ-FeS przesunęło się z pozycji  $g = 1,944$  (w paśmie X) do pozycji  $g = 1,964$  (w paśmie Q). Oba widma przedstawiono na rycinie 5A.

Odkrycia stanu SQ-FeS dokonano na wyizolowanym cytochromie  $bc_1$  przy zastosowaniu substytutów naturalnego ubichinolu. Pojawiły się zatem pytania, czy stan ten tworzy się również w białku w obecności natywnego substratu w aktywnych błonach bioenergetycznych oraz czy tworzy się on również w cytochromie  $bf$ . W celu sprawdzenia czy stan SQ-FeS tworzy się w układach błonowych, wykorzystano izolowane błony bioenergetyczne bakterii purpurowych *Rhodobacter (R.) capsulatus* [28]. Zawieszinę błon naświetlano bezpośrednio przed zamrożeniem w warunkach ustalonego potencjału redoks, takiego by cytochrom  $c$  w ciemności pozostawał zredukowany, natomiast pula ubichinonu w była większości utleniona. Dzięki aktywności wzbudzonego światłem fotosyntetycznego centrum reakcji ubichinon był redukowany, a cytochrom  $c$  utleniany, przez co były zapewnione substraty dla cytochromu  $bc_1$ . W takich warunkach udało się zaobserwować sygnał SQ-FeS. Ponieważ bakterie *R. capsulatus* posiadają również enzymy, które są odpowiednikami kompleksów II i IV mitochondrialnego łańcucha transportu elektronów, możliwe okazało się wygenerowanie stanu SQ-FeS przez dodatek bursztynianu do izolowanych błon w atmosferze tlenowej (Ryc. 4D) w obecności światła. W tym przypadku, za redukowaniem chinonu



**Rycina 6.** Wpływ wybranych mutacji na produkcję anionorodnika ponadtlenkowego ( $O_2^-$ ) i stan SQ-FeS. Panel A: zależność między amplitudą sygnału SQ-FeS i produkcją  $O_2^-$  przez zainhibowaną antymycyną formę dziką cytochromu *bc<sub>1</sub>* i muteiny z różnym rozkładem położenia białka żelazowo-siarkowego. Panel B: porównanie amplitudy sygnału EPR stanu SQ-FeS w próbach przygotowanych w warunkach tlenowych i beztlenowych dla wybranych mutein i formy dzikiej cytochromu *b<sub>6</sub>f*. Panel C: poglądowa ilustracja przedstawiająca prawdopodobieństwo znalezienia białka żelazowo-siarkowego w miejscu  $Q_0$  w wybranych muteinach oraz w formie dzikiej cytochromu *bc<sub>1</sub>*.

oraz utlenianie cytochromu *c*, odpowiedzialne były odpowiednio kompleks II oraz kompleks IV.

Chociaż w innych enzymach łańcucha transportu elektronów występują niskopotencjałowe klastry żelazowo-siarkowe o widmie EPR podobnym do tego jakie posiada stan SQ-FeS, to możliwe jest odróżnienie sygnału SQ-FeS od sygnałów owych klastrów. Jest tak dzięki niewielkiej różnicy w położeniu przejść na widmach EPR. Ponadto, ze względu na niski potencjał redoks, sygnał tych klastrów pojawia się w warunkach, w których praktycznie stan SQ-FeS nie powstaje, gdyż następuje wtedy całkowita redukcja puli cytochromu *c* i puli *Q*. To zaś uniemożliwia funkcjonowanie cytochromu *bc<sub>1</sub>*.

Stan SQ-FeS wygenerowano też w cytochromie *b<sub>6</sub>f* (Ryc. 5B). Przeprowadzono w tym celu eksperymenty z izolowanym cytochromem *b<sub>6</sub>f* podobne do tych, w których po raz pierwszy zaobserwowano sygnał SQ-FeS w cytochromie *bc<sub>1</sub>* [29], przy użyciu odpowiednich dla cytochromu *b<sub>6</sub>f* substratów: decylplastochinolu oraz plastocyaniny utlenionej żelazicyjankiem potasu. Ponieważ obecnie nie ma skutecznych inhibitorów miejsca  $Q_1$  dla cytochromu *b<sub>6</sub>f*, eksperymenty przeprowadzono na nieinhibowanym białku. Co ciekawe, pomimo tego że inhibicja miejsca  $Q_1$  była konieczna dla wygenerowania SQ-FeS w cytochromie *bc<sub>1</sub>*, okazało się, że nie było to konieczne w przypadku cytochromu *b<sub>6</sub>f*. Badania te pokazały, że prawdopodobieństwo powstania stanu SQ-FeS, w trakcie gdy enzym prowadzi reakcję, jest większe w cytochromie *b<sub>6</sub>f* w porównaniu z cytochromem *bc<sub>1</sub>*. Fakt ten można tłumaczyć niższym potencjałem redoks hemów *b* w cytochromie *b<sub>6</sub>f* niż w cytochromie *bc<sub>1</sub>* oraz wyższym potencjałem redoks plastochinonu w stosunku do potencjału ubichinonu. W kontekście mechanizmu postulowanego wcześniej dla cytochromu *bc<sub>1</sub>*,

sprzyałoby to reakcji częściowej redukcji plastochinonu w miejscu  $Q_0$  i powstawaniu stanu SQ-FeS. Dodatkowym czynnikiem sprzyjającym tej reakcji wydaje się być obecność hemu *c<sub>1</sub>*. Właściwości tego hemu sugerują, że może on spowalniać reakcję transferu elektronu między hemami *b* a miejscem  $Q_0$ , co w pewien (choć znacznie bardziej ograniczony) sposób odpowiadałoby warunkom inhibicji  $Q_1$  przez antymycynę w cytochromie *bc<sub>1</sub>*. Nasuwa się przy tym pytanie, czy większe prawdopodobieństwo powstania stanu SQ-FeS w cytochromie *b<sub>6</sub>f* jest jedynie przypadkowym i nieistotnym fizjologicznie efektem wynikającym z wartości redoks substratów i kofaktorów, czy też jest istotnym elementem mechanizmów, które stały się efektem presji ewolucyjnej? Wszakże cytochrom *b<sub>6</sub>f* jest częścią fotosyntetycznego łańcucha transportu elektronów, w którym enzymy pracują w specyficznych warunkach sprzyjających niepożądanym reakcjom ubocznym, gdzie strumień fotonów, odpowiedzialny za generowanie stanów o wysokiej energii, może w ciągu milisekund zmienić się wiele rzędów wielkości, a białka katalizujące reakcje redoks pracują w wysokim stężeniu tlenu.

#### ZALEŻNOŚĆ MIĘDZY SYGNAŁEM SQ-FeS ORAZ PRODUKCJĄ ANIONORODNIKA PONADTLENKOWEGO

W reakcji ubocznej utleniania chinolu w miejscu  $Q_0$  cytochromów z rodziny *bc* może powstawać anionorodnik ponadtlenkowy ( $O_2^-$ ) będący reaktywną formą tlenu. W przypadku cytochromu *bc<sub>1</sub>* produkcję tę można mierzyć przez porównanie enzymatycznej redukcji cytochromu *c* zarówno w obecności i przy braku dysmutazy ponadtlenkowej [13]. Różnica w obserwowanym tempie redukcji cytochromu *c* w obu przypadkach, w stosunku do tempa redukcji cytochromu *c* bez dysmutazy, jest miarą produk-

cji  $O_2^-$ . Zauważono, że mutacje +1Ala oraz +2Ala, w której ruchoma domena hydrofilowa białka żelazowo-siarkowego jest przesunięta w stronę miejsca  $Q_O$ , wykazują mniejszą produkcję  $O_2^-$  [11,30], natomiast mutacja G167P, która przesuwa domenę w przeciwnym kierunku (utrudnia dokowanie się domeny do miejsca  $Q_O$ ), zwiększa produkcję  $O_2^-$  [17,31]. Co więcej, zestawienie produkcji  $O_2^-$  w zainhibowanych antymycyną formach cytochromu  $bc_1$  z maksymalnym sygnałem SQ-FeS [32], pokazało wyraźną negatywną korelację pomiędzy ilością generowanego  $O_2^-$  a amplitudą obserwowanego sygnału SQ-FeS (Ryc. 6A). W opisanym eksperymencie próbki były w równowadze z powietrzem atmosferycznym, a zatem istniała potencjalna możliwość redukcji  $O_2$  do  $O_2^-$  przez SQ-FeS. Jednakże, gdyby taka reakcja miała miejsce, to w analogicznych eksperymentach przeprowadzonych w warunkach beztlenowych obserwowany byłby wzrost amplitudy sygnału SQ-FeS. Co jak pokazały wyniki zestawione na rycinie 6B, nie miało miejsca.

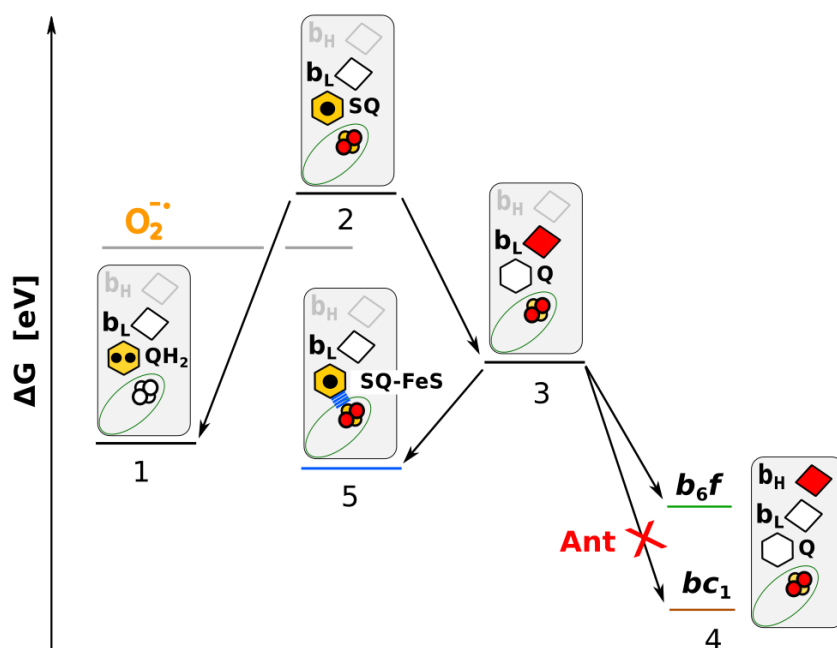
Można zatem postulować, że SQ-FeS nie jest reaktywny z tlenem cząsteczkowym, co z kolei sugeruje, że może on przyczyniać się do zmniejszania prawdopodobieństwa zachodzenia reakcji prowadzących do produkcji reaktywnych form tlenu. [32]. Ciekawym jest fakt, że w przypadku mutein podwójnych G167P+1Ala, oraz G167P+2Ala mimo dystrybucji ruchomej domeny białka żelazowo-siarkowego przesuniętej w stronę miejsca  $Q_O$ , sygnał SQ-FeS prawie nie pojawia się lub jest niewielki, a produkcja  $O_2^-$  jest znaczna. Oznacza to, że kluczowe dla powstawania SQ-FeS i zabezpieczenia przed produkcją reaktywnych form tlenu w miejscu  $Q_O$  jest bezpośrednie oddziaływanie FeS z semichinonem, które we wspomnianych muteinach podwójnych

jest zaburzone pomimo bliskiej odległości między klastrem a miejscem  $Q_O$ .

### SQ-FeS JAKO DODATKOWY METASTABILNY STAN W KATALIZIE ENZYMU

Rozważając prezentowane wyniki można dojść do kilku istotnych wniosków dotyczących położenia stanu SQ-FeS na diagramie energetycznym uwzględniającym poszczególne stany, w których znajduje się cytochrom  $bc_1$  lub cytochrom  $b_6f$  w czasie katalizy (Ryc. 7). Ogólnie przyjęty model funkcjonowania cytochromów z rodziny  $bc$  zakłada, że reakcja bifurkacji w miejscu  $Q_O$  przebiega przez wysoce niestabilny, nieuchwytny eksperymentalnie, semichinon, który jest reaktywny z tlenem. Oznacza to, że energia takiego semichinonu jest na tyle wysoka, że stacjonarne obsadzenie tym stanem jest bardzo małe, a reakcja transferu elektronu na tlen egzoergiczna. Stan SQ-FeS jest niereaktywny z tlenem, a jego obsadzenie w cytochromie  $bc_1$  zainhibowanym antymycyną jest rzędu kilkudziesięciu procent [29]. Oznacza to, że SQ-FeS jest znacznie niżej na diagramie energetycznym niż niestabilny semichinon.

Ponieważ stan SQ-FeS jest obserwowany wraz z utlenionym hemem  $b_L$  oznacza to, że stan SQ-FeS jest również poniżej stanu, w którym elektron znajduje się na hemie  $b_L$ , a w miejscu  $Q_O$  jest chinon. W przypadku cytochromu  $bc_1$  do wygenerowania SQ-FeS w ilości pozwalającej na detekcję konieczne jest zablokowanie odpływu elektronów przez miejsce  $Q_r$ , a tym samym brak możliwości transferu elektronu z hemu  $b_L$  na  $b_H$ . Oznacza to, że w przypadku cytochromu  $bc_1$  stan, w którym elektron znajduje się na hemie  $b_H$ , a w miejscu  $Q_O$  jest chinon, posiada znacznie niższą energię niż stan SQ-FeS. W



**Rycina 7.** Uproszczony diagram energetyczny cytochromów  $bc_1$  i  $b_6f$ . Na diagramie zaznaczone są kolejne stany reakcji katalizacyjnej w miejscu  $Q_O$ . 1) Stan przed rozpoczęciem reakcji bifurkacji - miejsce  $Q_O$  obsadzone chinolem, FeS oraz hem  $b_L$  utlenione. 2) Stan przejściowy - niestabilny semichinon oraz zredukowany FeS, utleniony hem  $b_L$ . 3) Stan po pełnym utlenieniu chinolu - miejsce  $Q_O$  obsadzone chinonem, FeS oraz hem  $b_L$  zredukowane. 4) Dalszy etap reakcji po transferze elektronu z hemu  $b_L$  na hem  $b_H$ . Stan ten ma inną energię w cytochromie  $bc_1$  i  $b_6f$  ze względu na inny potencjał hemu  $b_H$  w obu enzymach. 5) Stan SQ-FeS z utlenionym hemem  $b_L$ . Różni się od stanu 2 pojawieniem się oddziaływania między SQ, a klastrem żelazowo-siarkowym. Inhibicja cytochromu  $bc_1$  antymycyną powoduje zatrzymanie odpływu elektronów z hemu  $b_H$ , który pozostaje zredukowany we wszystkich stanach przedstawionych na rycinie uniemożliwiając utlenienie hemu  $b_L$ . Stan redoks hemu  $b_H$  w stanach 1-4 oraz 5 nie jest rozważany w kontekście energii układu. Na rycinie zaznaczono również energie układu, w którym elektron trafia na tlen tworząc anionorodnik ponadtlenkowy.

przypadku cytochromu *b<sub>f</sub>* zablokowanie odpływu elektronów przez miejsce *Q<sub>i</sub>* nie jest konieczne, by zaobserwować ten stan. Najprawdopodobniej jest to związane z niższym potencjałem redoks hemu *b<sub>Hr</sub>*, co skutkuje tym, że różnica między stanem SQ-FeS a stanem ze zredukowanym hemem *b<sub>H</sub>* jest znacznie mniejsza niż w przypadku cytochromu *bc<sub>1</sub>*. Przez to możliwe jest częściowe obsadzenie stanu SQ-FeS nawet pod nieobecność inhibitora. Można zatem powiedzieć, że SQ-FeS jest niereaktywnym z tlenem stanem metastabilnym, który jest lokalnym minimum energetycznym, obsadzonym z dużym prawdopodobieństwem w sytuacji, gdy odpływ elektronów z hemów *b* poprzez miejsce *Q<sub>i</sub>* jest utrudniony.

Rozważając przebieg czasowy narastania sygnału SQ-FeS (Ryc. 4C) można zauważyć, że obsadzenie tym stanem osiąga maksimum w czasie co najmniej dwa rzędy wielkości dłuższym niż czas pojedynczej reakcji enzymatycznej, który wynosi kilka milisekund. Na tej podstawie można sądzić, że stan SQ-FeS nie jest stanem przejściowym utleniania chinolu w miejscu *Q<sub>o</sub>* lecz dodatkowym stanem, jaki może przyjąć enzym. Innymi słowy, stan SQ-FeS można nazwać „bezpiecznym buforem dla elektronów”, który może być obsadzony, by zapobiec niepożądanym reakcjom ubocznym [28].

## PODSUMOWANIE

Prowadzone w ostatniej dekadzie badania EPR cytochromów *bc* zaowocowały nieoczekiwanym odkryciem w miejscu *Q<sub>o</sub>* semichinonu sprzężonego z klastrem żelazowo-siarkowym (SQ-FeS). Względnie wysoka stabilność stanu SQ-FeS oraz jego niereaktywność z tlenem stała w sprzeczności z większością przyjętych teorii na temat możliwych stanów przejściowych w reakcji bifurkacji katalizowanej przez miejsce *Q<sub>o</sub>*. Kompleksowa analiza wyników eksperymentalnych pozwoliła jednak na umiejscowienie stanu SQ-FeS na diagramie energetycznym cytochromów z rodziny *bc*, tak, by można było wytłumaczyć obserwacje dotyczące tego stanu w kontekście dotychczas zdobytej wiedzy o tej grupie enzymów. Na diagramie tym, stan SQ-FeS jest lokalnym minimum energetycznym, co tłumaczy jego metastabilny charakter i niereaktywność z tlenem cząsteczkowym. Takie usytuowanie stanu SQ-FeS na diagramie jest punktem wyjścia do rozważań o potencjalnej roli tego stanu w mechanizmach zabezpieczających przed wystąpieniem wolnorodnikowych reakcji ubocznych. Można też przypuszczać, że opisanie dynamiki powstawania i zaniku stanu SQ-FeS na poziomie molekularnym przyczyni się do zrozumienia mechanizmu samej reakcji bifurkacji w miejscu *Q<sub>o</sub>*, a przez to zrozumienia wydajności energetycznej enzymu.

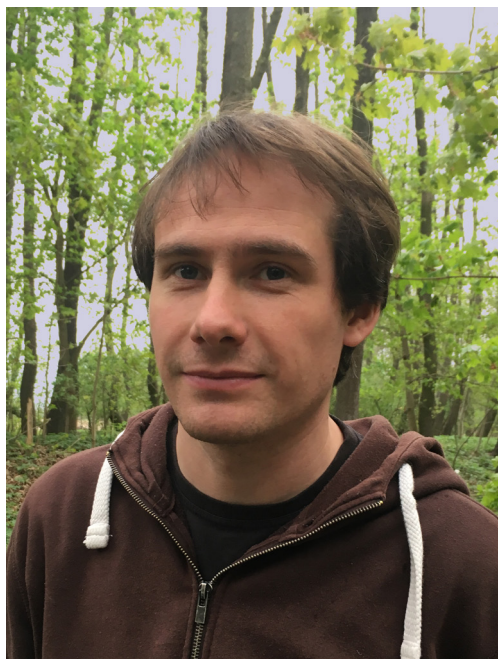
Wciąż pozostaje wiele ciekawych pytań dotyczących stanu SQ-FeS. Szczególnie istotne wydają się te, które dotyczą znaczenia fizjologicznego tego stanu, zarówno w układach oddechowych jak i fotosyntetycznych. Aby na nie odpowiedzieć, konieczne będzie gruntowne przebadanie nie tylko bakteryjnego cytochromu *bc<sub>1</sub>*, i roślinnego cytochromu *b<sub>f</sub>* (enzymy te były dotychczasowym przedmiotem badań w tym zakresie), ale także mitochondrialnego kompleksu III oraz cytochromów *bc<sub>1</sub>* katalizujących utlenianie menachinonów, tak, by objąć enzymy ewolucyjnego spektrum organizmów beztlenowych i tlenowych.

## PIŚMIENNICTWO

- Baniulis D, Yamashita E, Zhang H, Hasan SS, Cramer WA (2008) Structure-function of the cytochrome *b<sub>6f</sub>* complex. *Photochem Photobiol* 84: 1349–1358
- Darrrouzet E, Cooley JW, Daldal F (2004) The cytochrome *bc<sub>1</sub>* complex and its homologue the *b<sub>f</sub>* complex: similarities and differences. *Photosynth Res* 79: 25–44
- 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 . <https://doi.org/10.1152/physrev.00006.2014>
- Darrrouzet E, Moser CC, Dutton PL, Daldal F (2001) Large scale domain movement in cytochrome *bc<sub>1</sub>*: a new device for electron transfer in proteins. *Trends Biochem Sci* 26: 445–451 . [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(01\)01897-7](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(01)01897-7)
- Osyczka A, Moser CC, Dutton PL (2005) Fixing the Q cycle. *Trends Biochem Sci* 30: 176–182 . <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2005.02.001>
- Crofts AR, Hong S, Ugulava N, Barquera B, Gennis R, Guergova-Kuras M, Berry EA (1999) Pathways for proton release during ubiquinol oxidation by the *bc<sub>1</sub>* complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 10021–10026 . <https://doi.org/10.1073/Pnas.96.18.10021>
- Link TA (1997) The role of the „Rieske” iron sulfur protein in the hydroquinone oxidation (*Q<sub>p</sub>*) site of the cytochrome *bc<sub>1</sub>* complex. *FEBS Lett* 412: 257–264 . [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)00772-2](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)00772-2)
- Cape JL, Bowman MK, Kramer DM (2005) Understanding the cytochrome *bc* complexes by what they don't do. The Q-cycle at 30. *Trends Plant Sci* 11: 46–55 . <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.11.007>
- 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<sub>1</sub>*. *Science* 329: 451–454 . <https://doi.org/10.1126/science.1190899>
- 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<sub>1</sub>*. Implications for the mechanism of superoxide production. *Biochim Biophys Acta* 1797: 1820–1827 . <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.07.005>
- Borek A, Sarewicz M, Osyczka A (2008) Movement of the iron-sulfur head domain of cytochrome *bc<sub>1</sub>* transiently opens the catalytic *Q<sub>o</sub>* site for reaction with oxygen. *Biochemistry* 47: 12365–12370 . <https://doi.org/10.1021/bi801207f>
- Wood PM (1988) The potential diagram for oxygen at pH 7. *Biochem J* 253: 287–289
- Muller F, Crofts AR, Kramer DM (2002) Multiple Q-cycle bypass reactions at the *Q<sub>o</sub>* site of the cytochrome *bc<sub>1</sub>* complex. *Biochemistry*. <https://doi.org/10.1021/bi025581e>
- Valgimigli L, Amorati R, Funo MG, DiLabio GA, Pedulli GF, Ingold KU, Pratt DA (2008) The unusual reaction of semiquinone radicals with molecular oxygen. *J Org Chem* 73: 1830–1841
- Dröse S, Brandt U (2008) The mechanism of mitochondrial superoxide production by the cytochrome *bc<sub>1</sub>* Complex. *J Biol Chem*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M803236200>
- Pintscher S, Kuleta P, Bujnowicz Ł, Sarewicz M, Osyczka A (2014) Molekularny mechanizm reakcji katalitycznych i produkcji wolnych rodników przez cytochrom *bc<sub>1</sub>*. *Postepy Biochem* 60: 285–294
- Borek A, Ekiert R, Osyczka A (2016) Molekularne efekty mutacji mitochondrialnych w genie kodującym cytochrom *b* kompleksu III i ich wpływ na poziom produkcji wolnych rodników. *Postepy Biochem* 1: 162–172
- Bartosz G (2003) Druga twarz tlenu, wydanie dr. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa
- Bleier L, Dröse S (2013) Superoxide generation by complex III: From mechanistic rationales to functional consequences. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* 1827: 1320–1331 . <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.12.002>
- Dröse S, Hanley PJ, Brandt U (2009) Ambivalent effects of diazoxide on mitochondrial ROS production at respiratory chain complexes I and III. *Biochim Biophys Acta* 1790: 558–565



21. 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
22. Zhang H, Osyczka A, Dutton PL, Moser CC (2007) Exposing the complex III  $Q_o$  semiquinone radical. *Biochim Biophys Acta* 1767: 883–887. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2007.04.004>
23. 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. <https://doi.org/10.1073/pnas.0702621104>
24. 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. <https://doi.org/10.1021/bi400624m>
25. Pietras R, Sarewicz M, Osyczka A (2016) Distinct properties of semiquinone species detected at the ubiquinol oxidation  $Q_o$  site of cytochrome  $bc_1$  and their mechanistic implications. *J R Soc Interface* 13: 1–11. <https://doi.org/10.1098/rsif.2016.0133>
26. Calvo R (2007) EPR measurements of weak exchange interactions coupling unpaired spins in model compounds. *Appl Magn Reson* 31: 271–299. <https://doi.org/10.1007/BF03166261>
27. 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. <https://doi.org/10.1063/1.477786>
28. Sarewicz M, Bujnowicz Ł, Osyczka A (2018) Generation of semiquinone- $[2Fe-2S]^{+}$  spin-coupled center at the  $Q_o$  site of cytochrome  $bc_1$  in redox-poised, illuminated photosynthetic membranes from *Rhodobacter capsulatus*. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* 1859: . <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2017.11.006>
29. Sarewicz M, Bujnowicz Ł, Bhaduri S, Singh SK, Cramer WA, Osyczka A (2017) Metastable radical state, nonreactive with oxygen, is inherent to catalysis by respiratory and photosynthetic cytochromes  $bc_1/b_f$ . *Proc Natl Acad Sci U S A* 114: 1323–1328. <https://doi.org/10.1073/pnas.1618840114>
30. Borek A, Ekiert R, Osyczka A (2018) Advances in understanding mechanism and physiology of cytochromes *bc*. W: Wikström M (red) Mechanisms of primary energy transduction in biology. Royal Society of Chemistry, London, s. 192–214
31. 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. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.661314>
32. Bujnowicz Ł, Sarewicz M (2019) Suppression of superoxide production by a spin-spin coupling between semiquinone and the Rieske cluster in. *FEBS Lett* 593: 3–12. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13296>



## Dr Łukasz Bujnowicz

Jestem absolwentem biofizyki Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Obecnie pracuję w Zakładzie Biofizyki Molekularnej na tym samym wydziale. W mojej pracy koncentruję się nad badaniami reakcji utleniania-redukcji w łańcuchach transferu elektronów z wykorzystaniem technik biofizycznych, w szczególności spektroskopii elektronowego rezonansu paramagnetycznego. Mam nadzieję, że w najbliższych latach będę kontynuował swoje badania. W ramach moich zainteresowań naukowych rozwijam niskokosztową aparaturę do badania reakcji enzymatycznych. Prywatnie pasjonuję się wędkarstwem oraz paralotniarstwem, od zawsze lubiłem wszelkie wycieczki po lasach, górach i bezdrożach.

## Unusual semiquinone as an electron buffer in enzymatic quinone oxidation

Łukasz Bujnowicz, Marcin Sarewicz, Artur Osyczka ✉

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

✉corresponding author: artur.osyczka@uj.edu.pl

**Key words:** semiquinone, iron-sulfur cluster, EPR, cytochrome  $bc_1$ , cytochrome  $b_f$ , superoxide  
 Cytochromes  $bc_1$  and  $c_b$  are part of respiratory or photosynthetic machinery. The main role of these enzymes is to build proton motive force across the bioenergetic membranes by coupling the proton translocations with electron transfer from the pool of membrane-soluble quinones to water-soluble redox proteins. Despite many years of research, the mechanism of quinol oxidation is not fully understood. It is assumed that unstable form of a partially oxidized quinol – semiquinone is an intermediate state of this process and that it is also a potential electron donor in the side reaction of superoxide generation. This semiquinone has remained experimentally elusive over years but recently a semiquinone interacting with the reduced iron-sulfur cluster was identified as a new state of the enzyme. The results indicate that semiquinone coupled to the iron-sulfur cluster is most probably an additional state that can prevent side reactions, including superoxide generation.