

Do najważniejszych szlaków biochemicznych służących pozyskaniu energii przez żywe organizmy należy oddychanie komórkowe oraz fotosynteza. Jednym z enzymów biorących udział w tych procesach są białka błonowe należące do rodziny cytochromów bc, które wykorzystują energię zgromadzoną w przenośnikach elektronów (donory i akceptory elektronów) do aktywnego transportu protonów w poprzek błony komórkowej. Dzięki temu cytochromy bc przyczyniają się do budowy siły napędowej dostępnej dla różnych procesów biochemicznych podtrzymujących życie. Szczególnie intrygującą reakcją związaną z aktywnością tych enzymów jest reakcja tzw. zależnej od chinonów elektronowej bifurkacji. Polega ona na rozszczepieniu dróg transportu elektronów z donoru, którymi są chinony, na dwie osobne gałęzie akceptorów (kofaktorów) będących integralnymi składnikami tych enzymów. Proces ten jest niezwykle wydajny przy jednoczesnej minimalizacji ryzyka reakcji ubocznych mogących zmniejszać wydajność konwersji energii oraz mogących stanowić źródło szkodliwych reaktywnych cząsteczek, które przyczyniają się do degradacji komórek. Sama reakcja bifurkacji w szerszym kontekście ma ogromne znaczenie w regulacji procesów bioenergetycznych i utrzymania równowagi redoks komórek, a mutacje upośledzające ten proces są przyczyną ciężkich genetycznych chorób metabolicznych. Co więcej, celowane inhibitory miejsca gdzie zachodzi ta reakcja mają ogromne znaczenie w zwalczaniu infekcji grzybiczych czy pasożytów takich jak np. zarodźce malarii. Przez fakt, że reakcja bifurkacji stanowi centralny punkt komórkowego przekształcania energii opartej o chinony, jej zrozumienie stanowi jedno z największych wyzwań współczesnej bioenergetyki.

Mimo wielu wcześniejszych badań nad bifurkacją jej mechanizm molekularny i kwantowy nie został wyjaśniony. Skutkiem tego stało się ugruntowanie dwóch wzajemnie wykluczających się modeli reakcji, z których każdy napotyka na swoje problemy interpretacyjne w kontekście istniejących danych eksperymentalnych. Dodatkowo szereg wyników wydaje się być częściowo niezgodna ze sobą. Powoduje to problemy interpretacyjne oraz wymaga stosowania pewnych założeń, które niekoniecznie muszą być słuszne. Obecnie dokonujący się przełom w możliwościach badań na poziomie molekularnym i kwantowym otwiera nowe drogi do poznania fenomenu tej niezwyklej reakcji o ogromnym znaczeniu w świecie żywych organizmów.

Kilka naszych ostatnich prac doprowadziło do odkrycia nowych stanów przejściowych (tzw. stanów metastabilnych) związanych z procesem bifurkacji w cytochromie bc₁, a nowe dostępne techniki takie jak obliczenia kwantowe oraz metody mikroskopii krioelektronowej (cryo-EM) pozwalają na przeprowadzenie dogłębnych badań związanych molekularnym i kwantowym mechanizmem katalizy tych białek. W niniejszym wniosku planowane jest przeprowadzenie badań z wykorzystaniem tych dwóch technik w połączeniu z metodami niskotemperaturowych pomiarów spektroskopowych elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR) i metod optycznych oraz elektrochemicznych na bakteryjnym modelu cytochromu bc₁ pochodzącego z *Rhodobacter capsulatus*.

W projekcie zaplanowane są badania związane z kinetyką powstawania i zaniku stanów przejściowych z użyciem szeregu mutacji, które zmieniają powinowactwo elektronowe oraz modyfikują postulowane ścieżki przenoszenia protonów. Zbadane zostaną oddziaływania form przejściowych, generowanych przez naturalne oraz syntetyczne semichinony, z otoczeniem reszt aminokwasowych, a także przebadany zostanie efekt ruchu domeny jednej z podjednostek tego białka na wewnętrzne środowisko protonowe mające wpływ na równowagi stanów przejściowych. Wykorzystane zostanie podejście spektroskopowe z wykorzystaniem impulsowego EPR oraz temperaturowych zależności zmiany równowag pomiędzy poszczególnymi etapami reakcji. Dane strukturalne uzyskane z cryo-EM zostaną wykorzystane do konstrukcji odpowiednich modeli, na których przeprowadzone zostaną obliczenia kwantowe mające za zadanie wyznaczenie prawdopodobnych dróg reakcji w zależności od zmieniających się warunków strukturalnych i funkcjonalnych. Rezultaty obliczeń kwantowych zostaną porównane z danymi uzyskanymi z pomiarów spektroskopowych w celu weryfikacji poprawności obliczeń w kontekście ich zgodności z eksperymentem. Dodatkowym zadaniem będzie analiza wpływu zmiany stanów spinowych kofaktorów (hemy b) na procesy transferu elektronu w układach aktywowanych światłem, w pomiarach kinetycznych na izolowanych białkach oraz na ustalanie się równowagi termicznej w stanach stacjonarnych przy różnych wartościach potencjału zewnętrznego redoks.

Podsumowując, celem proponowanych badań jest poznanie uniwersalnego mechanizmu molekularnego związanego z katalizą chinonów przez cytochromy bc z uwzględnieniem efektów kwantowych. Oczekujemy, że przyczyni się to do zrozumienia efektywności katalizy co jest istotne w kontekście badań nad innymi enzymami bioenergetycznymi działającymi w oparciu o chinonowe przenośniki elektronów. W nieco dalszej perspektywie poznanie mechanizmów tej reakcji przyczyni się do rozwoju kolejnego etapu badań, w których możliwa będzie konstrukcja nowych, syntetycznych enzymów katalizujących nowe reakcje redoks w oparciu o rozwiązania istniejące w przyrodzie.