

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Chemijos ir geomokslų fakultetas



Biochemijos studijų programos magistrantas

Mindaugas LESANAVIČIUS

Magistrinis darbas

**Elektronų pernaša daugiacentriniuose flavininiuose
fermentuose**

Darbo vadovas

Habil. dr. N. Čėnas

Vilnius 2017

SANTRAUKA

Daugiacentriniai flavininiai fermentai, priklausantys dehidrogenazėms – elektrontransferazėms, transformuoja dvielektroninį pernešimą į vienelektroninį ir yra svarbūs tiek biosensorikos, tiek ksenobiotikų metabolizmo požiūriu. Iš substrato paimti du elektronai redukuoja flaviną ir nuosekliai po vieną vidumolekulinės pernašos būdu perduodami į toliau esantį hemą, iš kurio tarpmolekulinės pernašos būdu perduodami į galutinį elektronų akceptorių. Darbo metu stacionarios kinetikos ir elektrocheminiais metodais buvo tirti du šios klasės atstovai: mielių *Saccharomyces cerevisiae* flavocitochromas b_2 (fcb2) ir bakterijų *Staphylococcus aureus* flavohemoglobinas (fHb). Darbo tikslas buvo šių fermentų katalizuojamų reakcijų metu vykstančios elektronų pernašos tyrimas su nefiziologiniais elektronų akceptoriais chinonais. fcb2 atveju matomas reakcijos greičio didėjimas didėjant chinono redukcijos potencialui. Be to, atsižvelgiant į ankstesnius mūsų tyrimus su fcb2 ir fermento savybes, atlikti elektrocheminiai tyrimai su įvairiais elektronų akceptoriais modifikuotais elektrodais siekiant įvertinti fcb2 pritaikymą biosensorikoje. *L*-laktato elektrooksidacija prasideda ties imobilizuoto mediatoriaus oksidacijos potencialu, o mediatoriaus elektrocheminiams virsmams būdinga elektronų pernašos konstanta siekė $\sim 0,7 \text{ s}^{-1}$. Be to, stebėtas K_M^{app} sumažėjimas lyginant su homogenine katalize, tačiau tirtų sistemų gyvavimo pusamžis trumpas. fHb katalizuojamos redukcijos reakcijos kinetikai būdingas „ping-pong“ mechanizmas. Stacionarios kinetikos sąlygomis chinonų reakingumo didėjimas didėjant jų oksidacijos – redukcijos potencialui yra prastai išreikštas, o tai galima susieti su pagrindinai dvielektroniniu šios reakcijos pobūdžiu. Slopinimo azolo dariniais tyrimai rodo fHb reakcijos su chinonais aktyvaciją sumažinant NADH K_M , o tai leidžia galvoti apie šių junginių kombinacijos pritaikymą vaistų kūrimui.

Electron transfer in multicenter flavoenzymes

SUMMARY

Multicenter flavoenzymes that belong to dehydrogenases – electron transferases convert two-electron transfer into one-electron transfer and are important both in biosensorics and xenobiotics metabolism. Two electrons are transferred from the substrate to reduce the flavin which reduces heme in two intramolecular one-electron transfers. These electrons are then transferred intermolecularly to the terminal electron acceptor. Two members of this class were studied using steady-state kinetics and electrochemistry, namely flavocytochrome b_2 (fcb2) from yeast *Saccharomyces cerevisiae* and flavohemoglobin (fHb) from bacteria *Staphylococcus aureus*. The goal was to investigate the electron transfer during the reactions between said enzymes and nonphysiological electron acceptors quinones. It was shown that the reaction rate increases with increasing quinone redox potential in the case of fcb2. Based on our previous research on fcb2 and its properties we carried out electrochemical analysis to assess its proposed use in biosensorics. The electro-oxidation of *L*-lactate begins upon reaching the oxidation potential of the immobilized mediator with electron transfer constant equal to about $0,7 \text{ s}^{-1}$ during these electrochemical changes of the mediators. Moreover, the K_M^{app} was lower when compared to homogenous catalysis, but the half-life of these systems appeared to be quite short. It was found that the kinetics of fHb catalyzed reduction reaction exhibit a ping-pong mechanism. There is no clear dependence between quinone reactivity and increase in their redox potential, and this can be attributed to a mainly two-electron nature of this reaction. Azole inhibitors appear to activate the fHb reaction with quinones by lowering the K_M for NADH and this implies the combination of said compounds in target drug design.