



GÖTEBORGS UNIVERSITET

**Structural studies of  $ba_3$ -type  
cytochrome *c* oxidase using serial  
crystallography and X-ray  
absorption spectroscopy**

**Doris Zorić**

Institutionen för kemi och molekylärbiologi  
Naturvetenskapliga fakulteten

Akademisk avhandling för filosofie doktorsexamen i naturvetenskap, inriktning kemi, som med tillstånd från Naturvetenskapliga fakulteten kommer att offentligt försvaras fredag den 29. September, 2023 kl. 09:00 i Sal 2119 Hälsovetarebacken, Arvid Wallgrens Backe 1, Institutionen för kemi och molekylärbiologi, Medicinargatan 9c, Göteborg.



GÖTEBORGS UNIVERSITET

ISBN 978-91-8069-395-0 (print)

ISBN 978-91-8069-396-7 (PDF)

Available online at: [hdl.handle.net/2077/77578](http://hdl.handle.net/2077/77578)

## Svensk summering

Cytokromoxidas katalyserar reduktionen av molekyllärt syre till vatten. Energin som frigörs i den här processen används för att förflytta protoner "motströms" över ett energiöverförande biologiskt membran, vilket i sin tur möjliggör syntes av ATP. Sett till den nyckelroll som protonöverföringen har, så har det forskats utförligt på det här enzymet för flertalet organismer. Fastän många proteiner i cytokromoxidas superfamilj har karakteriserats strukturellt, så har ingen tidsupplöst information av detaljerna för hur elektronöverföringen är kopplad till protonöverföring erhållits.

Den miljardfaldiga ökningen av röntgenstrålningens briljans hos frielektronslasrar, i kombination med utvecklingen av seriell röntgenkristallografi, har föranlett möjligheterna för strukturbestämning av proteiner vid rumstemperatur. Det har i sin tur har banat vägen för studier av mätningar av ultrasnabba reaktioner hos proteiner. I ett försök att ta fältet vidare från ljuskänsliga proteiner, så har det långsiktiga forskningsmålet i våran grupp varit att använda tidsupplöst seriell femtosekundersröntgenkristallografi för att göra en utförlig strukturell undersökning av cytokromoxidasmekanismen.

Som ett första steg utfördes en tidsupplöst strukturell studie av den laserinducerade fotodissociationen av kolmonoxid från det aktiva sätet hos det reducerade bakteriella  $ba_3$  cytokromoxidaset, varpå de strukturella händelserna följdes i tiden. I en uppföljande studie följer vi de strukturella förändringarna då enzymet reagerar med molekyllärt syre som frigörs från ett koboltbaserat komplex vid laserilluminering. Som ett steg mot att utnyttja synkrotronstrålning samt att sänka introduktionströskeln för synkrotronbaserad seriell röntgenkristallografi, har vi designat samt experimentellt validerat en flödescell för seriell röntgenkristallografi vid rumstemperatur. Slutligen så har vi använt oss av röntgenabsorptionsspektroskopi för att undersöka elektronkonfiguration samt koordinationsgeometri för de järn- samt kopparinnehållande kofaktorerna i oxidasetts lika redoxstillstånd. Kvalitativ analys med röntgenabsorption nära kantstrukturer samt teoribaserade modeller för utökad röntgenabsorptionsfinstruktur understryker skillnader mellan analyserade prov, vilket möjliggör beräkningsbaserad bestämning av finstrukturen för oxidasetts redoxstillstånd samt en bättre förståelse för liganden vid det aktiva sätet. Arbetet presenterat i den här tesen understryker vikten av att använda olika metoder för att få en omfattande förståelse för enzymatisk reaktionsdynamik.

### Keywords:

$ba_3$ , cytokromoxidas, enzymatisk reaktionsdynamik, röntgenstrålningens, seriell röntgenkristallografi, röntgenabsorption