

## STRESZCZENIE

Cechą organizmów żywych, która odróżnia je od materii nieożywionej, jest ich zdolność do przemiany energii. Uniwersalnym nośnikiem energii w komórkach jest ATP, które syntetyzowane jest przez syntazę ATP. Do swojego działania enzym ten wykorzystuje siłę protonomotoryczną, która generowana jest przez transfer elektronów sprzężony z translokacją protonów w poprzek błony. Odbywa się to przy udziale wyspecjalizowanych kompleksów białek błonowych zdolnych do przeprowadzania reakcji oksydacyjno-redukcyjnych (redoks). Białka te zorganizowane są w tzw. łańcuch transportu elektronów, w którym kluczową rolę pełnią cytochromy z rodziny *bc*. Ich rolą jest transfer elektronów z chinolu na wysokopotencjałowy akceptor. Co ciekawe, u pewnej grupy bakterii, nieposiadających cytochromów z rodziny *bc*, odkryto enzym Alternatywny kompleks III (ACIII), który pełni tę samą funkcję co enzymy *bc*, ale różni się od nich składem podjednostkowym. Dalsze badania wykazały obecność genów kodujących podjednostki ACIII w genomach wielu innych gatunków bakterii, należących do różnych taksonów. Stosunkowo niedawno, używając metody cryo-EM, wyznaczono strukturę ACIII, nie wykazując żadnego podobieństwa strukturalnego do cytochromu *bc<sub>1/b<sub>6</sub>f</sub>*. Uzyskany model budowy enzymu i dostępne dane biochemiczne pozwoliły na zaproponowanie możliwych ścieżek transferu elektronów w obrębie ACIII, jednak postulowany mechanizm nie został do tej pory jednoznacznie potwierdzony. Wyjaśnienie zaproponowanego modelu działania ACIII było utrudnione i ograniczone ze względu na brak systemu do genetycznej modyfikacji tego enzymu.

W ramach tej rozprawy podjęto się zadania identyfikacji ścieżek transferu elektronów w obrębie kofaktorów hemowych ACIII, poprzez mutagenezę genów kodujących poszczególne podjednostki ACIII. Jako model badawczy wybrano *F. johnsoniae*, ponieważ wcześniejsze prace wykazały, że bakteria ta jest podatna na manipulacje genetyczne. Ponadto, w przypadku delekcji genów ACIII istnieje alternatywna ścieżka utleniania chinolu, wykorzystująca oksydazę chinolową *bd*, co pozwala na podtrzymanie metabolizmu bakterii.

Badania rozpoczęto od udoskonalenia dostępnych metod genetycznych do manipulacji w obrębie genów *F. johnsoniae* i skonstruowania **systemu genetycznego do delekcji i komplementacji genów alternatywnego kompleksu III**. Wykazano, że nadekspresja usuniętych białek jest letalna dla bakterii, dlatego konieczne było dostosowanie poziomu ekspresji tych genów z wektora plazmidowego. W tym celu skonstruowano szereg wektorów

ekspresyjnych z różną aktywnością promotora *ompA*, umożliwiających ekspresję białek ACIII. Opracowany system genetyczny pozwala na usunięcie wybranych genów u *F. johnsoniae* oraz umożliwia **regulację poziomu ekspresji białek** z wektora plazmidowego.

W pracy opisano następstwa delecji genów kodujących podjednostki hemowe alternatywnego kompleksu III (ActA oraz ActE). Przeprowadzone pomiary tlenometrii EPR wykazały, że usunięcie podjednostki ActA ( $\Delta A$ ) skutkuje brakiem aktywności oksydazy *aa<sub>3</sub>* (partnera redoks ACIII u *F. johnsoniae*). Natomiast delecja *actE* ( $\Delta E$ ) nie zmieniła aktywności cytochromu *aa<sub>3</sub>*, wskazując, że podjednostka **ActE nie jest potrzebna do przenoszenia elektronów między ACIII a oksydazą *aa<sub>3</sub>***. Niemniej jednak brak ActE negatywnie wpłynął na tempo wzrostu bakterii, sugerując istnienie innej, jeszcze niezidentyfikowanej funkcji tej podjednostki. W pracy omówiono możliwe wyjaśnienia tych obserwacji, m. in. wysunięto hipotezę o **rozdziale ścieżek transferu elektronów w miejscu styku podjednostek ActA i ActE**. Przeprowadzone komplementacje usuniętych genów (ekspresja z wektorów plazmidowych) przywróciły aktywność oksydazy oraz tempo wzrostu bakterii do poziomu WT. Analiza konsumpcji tlenu przez mutanta  $\Delta A$  wykazała istnienie dodatkowej, niezależnej od tlenu i wrażliwej na cyjanek, ścieżki transferu elektronów. Uzyskane wyniki sugerują, że *F. johnsoniae* wykorzystuje co najmniej trzy niezależne ścieżki do utleniania puli menachinonu.

Rozdział dróg transferu elektronów na poziomie podjednostki ActA zakłada zaangażowanie N-końcowej ruchomej domeny ActA - m $\Delta A$  – która umożliwiałaby kierowanie elektronów na różne ścieżki. Aby zweryfikować proponowaną rolę domeny m $\Delta A$ , skonstruowano mutanta pozbawionego tej domeny i wykazano, że zmutowany szczep nie wykazuje aktywności *aa<sub>3</sub>*, zatem przeniesienie elektronu z ACIII na cytochrom *aa<sub>3</sub>* nie zachodzi. Potwierdziło to, że **hem m $\Delta A$  jest bezpośrednim donorem elektronów dla oksydazy *aa<sub>3</sub>***.

W drugiej części rozprawy wykorzystano opracowany system genetyczny do dołączenia metki Strep do podjednostki ActE, co pozwoliło na wydajne oczyszczenie ACIII z wybranych mutantów. Dodatkowo skonstruowano mutanty *E. coli* umożliwiające ekspresję, a następnie oczyszczenie ActE oraz m $\Delta A$  jako rozpuszczalnych w wodzie cytochromów. Wyizolowane białka te poddano miareczkowaniu potencjometrycznemu, co pozwoliło na **wyznaczenie równowagowych potencjałów redoks** dla hemów ACIII. W ramach tej rozprawy podjęto również **próbę zmierzenia aktywności ACIII** z wykorzystaniem wybranych mutantów. Wyniki wstępne wykazały konieczność przeprowadzenia pomiarów dla ACIII w warunkach restrykcyjnie beztlenowych.

**Przedstawiony system do manipulacji genetycznych w obrębie ACIII z *F. johnsoniae* oferuje nowe narzędzie do badania molekularnego mechanizmu działania tego enzymu oraz możliwość jego zastosowania do badania innych białek tej bakterii i szczepów pokrewnych. Wyniki badań przeprowadzonych w ramach tej rozprawy po raz pierwszy umożliwiły wgląd w mechanizm molekularny ACIII oraz przyczyniły się do zdefiniowania ścieżek przenoszenia elektronów w obrębie superkompleksu ACIII-aa3.**

