

Streszczenie pracy doktorskiej mgr inż. Agnieszki Winiarskiej

Zależne od wolframu oksydoreduktazy aldehydu (AOR) to metaloenzymy, które katalizują utlenianie szerokiego spektrum aldehydów. AOR są również jedynymi enzymami, które mogą katalizować bezpośrednią redukcję nieaktywowanych kwasów karboksylowych do odpowiednich aldehydów, reakcję o niskim poziomie redoks wykorzystywaną w bakteryjnych systemach całokomórkowych do bioredukcji w celu wytworzenia alkoholi. AOR występują głównie w beztlenowych, termofilnych bakteriach i archeonach i są bardzo wrażliwe na tlen. W niniejszej pracy scharakteryzowano względnie odporne na tlen AOR z mezofilnej bakterii *Aromatoleum aromaticum* (AOR_{Aa}), jako biokatalizator o znaczącym potencjale aplikacyjnym do produkcji bioalkoholi i innych pochodnych aldehydów. Enzym posiada kofaktor wolframowo-metalopterynowy, w swoim centrum aktywnym znajdującym się w podjednostce AorB, który jest połączony przez łańcuch klastrów Fe₄S₄ w podjednostkach AorB i AorA z kofaktorem FAD w podjednostce AorC enzymu.

Podobnie do wcześniej scharakteryzowanych AOR, wykazano, że AOR_{Aa} redukuje kwasy karboksylowe do aldehydów w obecności silnych reduktorów (kompleksów Ti(III) i Eu(II)). Niespodziewanie odkryto, że AOR_{Aa} skutecznie wykorzystuje elektrony z utleniania H₂ do redukcji kwasów karboksylowych, co czyni je nowym typem hydrogenazy. Wykazano, że AOR_{Aa} redukuje kwasy alifatyczne, aromatyczne i heterocykliczne za pomocą wodoru jako donora elektronów. AOR_{Aa} wykazało aktywność hydrogenazy również w redukcji NAD⁺ i BV²⁺. Aktywność ta została zastosowana jako system recyklingu NADH dla reakcji kaskadowej z NADH-zależną dehydrogenazą alkoholu benzyłowego z *A. aromaticum* (BaDH). W kaskadzie AOR_{Aa} jednocześnie redukowało NAD⁺ do NADH i kwas benzoesowy do aldehydu, który następnie był przekształcany w alkohol benzyłowy przez BaDH kosztem NADH. Jedynym reduktorem netto do produkcji bioalkoholu w tej kaskadzie był wodór. Jednoczesna redukcja benzoesanu i NAD⁺ sprowokowała hipotezę, że AOR_{Aa} wykorzystuje bifurkację elektronów do redukcji kwasów karboksylowych, którą sfalsyfikowano w serii eksperymentów. Chociaż największą aktywność w redukcji kwasu obserwowano przy pH 5,0, a dla NAD⁺ przy pH 8,0, to obie reakcje były nadal katalizowane przy pH 7,0.

W ramach charakterystyki katalitycznej AOR_{Aa} wyznaczono pozorne parametry kinetyczne w stanie stacjonarnym dla wybranych akceptorów elektronów w utlenianiu i redukcji aldehydów wodorem.

W ramach tej pracy przeprowadzono charakterystykę strukturalną AOR_{Aa} za pomocą mikroskopii krioelektronowej i fotometrii masowej. Badanie wykazało, że AOR_{Aa} ma strukturę oligomeryczną Aor(AB)_nC, z najwyższym zaobserwowanym n wynoszącym pięć. Szczegóły

strukturalne dostarczone przez zrekonstruowaną mapę gęstości AOR_{Aa} o rozdzielczości 3,3 Å ujawniły znaczną homologię strukturalną AorB ze znaną strukturą AOR z *Pyrococcus furiosus*. Kofaktor znajdujący się w centrum aktywnym w obu białkach składa się z wolframu koordynowanego przez dwie metalopteryny i inne, nieznane ligandy, których identyfikacja jest kluczowa dla rozwiązania mechanizmu katalitycznego AOR. Ponieważ koordynacja wolframu nie jest możliwa do jednoznacznego rozwiązania za pomocą dyfrakcji rentgenowskiej, ani nawet metodami spektroskopowymi, zastosowano metody teoretyczne w celu znalezienia najbardziej prawdopodobnych ligandów. Zoptymalizowane metodami klastrową QM i QM:MM geometrie modeli kofaktora o różnych możliwych koordynacjach wolframu zostały zweryfikowane przez porównanie ze strukturą krystaliczną AOR z *P. furiosus*. Badania ujawniły najbardziej prawdopodobną strukturę utlenionego kofaktora wolframowego. Tymczasem identyfikacja ligandów wolframu w zredukowanym enzymie została umożliwiona przez otrzymane wyniki z EXAFS krawędzi W L_{III} dla AOR_{Aa}. Spostrzeżenia uzyskane z analizy wiązania cząsteczki benzoesanu w miejscu aktywnym z danych strukturalnych oraz nowo określony skład struktur utlenionych i zredukowanych, pozwoliły na sformułowanie nowej hipotezy mechanistycznej dla katalizowanego przez AOR utleniania aldehydu.