



Kraków, 30 maja 2023 roku

dr hab. Małgorzata Brindell, prof. UJ  
Zakład Chemii Nieorganicznej  
Wydział Chemii UJ

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Agnieszki Winiarskiej  
zatytułowanej  
„Tungsten aldehyde oxidoreductase from *Aromatoleum aromaticum* – biocatalyst for  
alcohol production”**

Praca doktorska Pani mgr Agnieszki Winiarskiej została przygotowana pod kierunkiem Pana prof. dr hab. Macieja Szaleńca z Instytutu Katalizy i Fizykochemii Powierzchni im. Jerzego Habera Polskiej Akademii Nauk oraz Pani dr hab. Anny Bodzoń-Kułąkowskiej, prof. AGH z Katedry Chemii Analitycznej i Biochemii Wydziału Inżynierii Materiałowej i Ceramiki Akademii Górniczo-Hutnicza im. Stanisława Staszica w Krakowie. Badania zostały wykonane w obu instytutach, jak również na Uniwersytecie w Marburgu w Niemczech pod kierunkiem Prof. Johanna Heidera.

Naukowcy od wielu lat zajmują się badaniami związanymi z wykorzystaniem enzymów jako biokatalizatorów, które mogą stanowić tańszą i wydajniejszą alternatywę dla chemicznie katalizowanych reakcji. Biokataliza w procesach produkcyjnych pozwala nie tylko na obniżenie kosztów energetycznych poprzez zastosowanie niższych temperatur czy ciśnień, ale również cechuje się lepszą selektywnością i wydajnością takich procesów. Wśród enzymów, które budzą zainteresowanie naukowców jako potencjalnych biokatalizatorów są enzymy zawierające kofaktor wolframowy. Badane są pod kątem wykorzystania ich w takich procesach jak biokatalizacyjna redukcja CO<sub>2</sub>, kwasów karboksylowych i związków aromatycznych lub konwersja acetyleny do aldehydu octowego. Jednak opracowanie takiego biokatalizatora, który będzie mógł mieć zastosowanie w przemyśle jest bardzo trudnym zadaniem ze względu na liczne parametry, które muszą zostać zoptymalizowane np. koszt produkcji biokatalizatora, jego odpowiednia stabilność czy cena i dostępność kofaktorów. Tematyka przedstawionej mi do oceny rozprawy doktorskiej p. Agnieszki Winiarskiej doskonale wpisuje się w ten obszar badawczy. Obejmuje ona odpowiedni dobór warunków eksperymentalnych do pozyskania enzymów (wolframowej oksydoreduktazy aldehydu (AOR) i dehydrogenazy alkoholu benzyłowego (BaDH)), badania ich aktywności, zaproponowania układu do biokatalizy obejmującego również regenerację kofaktora a dodatkowo zaproponowania struktury enzymu ze szczególnym uwzględnieniem kofaktora wolframowego i w oparciu o te dane zasugerowanie mechanizmu katalitycznego. Systematyczne i szczegółowe badania Doktorantki doskonale uzupełniają wiedzę na temat rodziny enzymów AOR.



Przedstawiona do oceny rozprawa napisana jest w języku angielskim. Praca rozpoczyna się streszczeniami w języku angielskim oraz polskim. Są one bardzo dobrze przygotowane i pozwalają w sposób zwięzły, ale dokładny na zapoznanie się z tematyką pracy, wykorzystywaną metodyką badawczą oraz otrzymanymi wynikami. Dalej w pracy znajduje się lista skrótów. Następnie Doktorantka w rozdziale „Literature review” dokonała przeglądu literatury na tematy bezpośrednio związane z pracą doktorską obejmującego m. in. pokazanie możliwości wykorzystania biokatalizy jako nowoczesnego podejścia w syntezie, które już znalazło zastosowanie w przemyśle. Dalej Doktorantka krótko omawia te aspekty reaktywności aldehydów, które pomogą jej w wyjaśnieniu mechanizmu reakcji katalizowanej przez badany enzym AOR. Kolejny rozdział dotyczy omówienia metod redukcji kwasów karboksylowych w celu otrzymania odpowiednich aldehydów w tym również opartych o wykorzystanie enzymów ze szczególnym uwzględnieniem reduktaz kwasu karboksylowego jako najlepiej poznanych biokatalizatorów tej reakcji. Następnie do szerszego omówienia Doktorantka wybrała enzymy zawierające w centrum aktywnym wolfram lub molibden wskazując ich istotne cechy, kofaktory i centra aktywne. Bardzo dokładne studium literaturowe zostało wykonane dla rodziny oksydoreduktaz aldehydów, co wyraźnie pozwala Recenzentowi na umiejscowienie tematyki badawczej rozprawy Pani mgr Winiarskiej na tle światowych dokonań w tej dziedzinie. Przytoczona jest też tutaj metodyka badawcza wykorzystywana do badań mechanistycznych i strukturalnych, które ze względu na wiele komplikacji są dużym wyzwaniem naukowym. I w swojej pracy Doktorantka nie tylko podjęła się takiego wyzwania, ale jej badania zostały uwieńczone sukcesem. Należy podkreślić, iż prace nad wolframową dehydrogenazą aldehydową z mezofilnej bakterii *Aromatoleum aromaticum* zostały rozpoczęte w grupie Prof. Heidera stosunkowo niedawno (co skrupulatnie zostało opisane we wstępie) a Pani Winiarska również brała udział w tych pracach co zaowocowało jej współautorstwem w publikacji pt. „Characterization of an Aldehyde Oxidoreductase From the Mesophilic Bacterium *Aromatoleum Aromaticum* EbN1, a Member of a New Subfamily of Tungsten-Containing Enzymes” opublikowanej w 2019 w *Frontiers in Microbiology*. W dalszej części wstępu teoretycznego poruszany jest aspekt dotyczący regeneracji kofaktora NAD(P)H oraz zaangażowania w ten proces hydrogenaz. Opisane jest zjawisko bifurkacji elektronów jak i wykorzystania techniki kriomikroskopii elektronowej do badania struktury białek. Wstęp teoretyczny oparty jest na 116 pracach naukowych.

Następny rozdział to już cel pracy wraz z uzasadnieniem potrzeby podjęcia zaplanowanych badań. Głównym celem pracy doktorskiej Pani mgr Winiarskiej była dogłębna charakterystyka wolframowej dehydrogenazy aldehydowej z mezofilnej bakterii *A. aromaticum* obejmująca zarówno aspekty strukturalne jak i katalityczne. Zostały również sformułowane poszczególne cele badawcze obejmujące biochemiczną i katalityczną charakterystykę tego enzymu, możliwość wykorzystania go w biokatalizie, analizę jego struktury ze szczególnym uwzględnieniem kofaktora wolframowego. Rozdział ten jest napisany bardzo przejrzysto i stanowi niejako plan badań realizowany w dalszej części pracy.



Kolejny rozdział pracy dotyczy materiałów i metodyki badań. Rozpoczyna się krótkim streszczeniem co jest zawarte w poszczególnych podrozdziałach i takie wprowadzenie jest świetnym pomysłem pozwalającym na stosunkowo szybkie zapoznanie się z poszczególnymi etapami pracy eksperymentalnej i teoretycznej Doktorantki. Jest to dość obszerny rozdział, ok. 60 stron, a każdy aspekt pracy laboratoryjnej jak i obliczeń teoretycznych został skrupulatnie opisany. Doktorantka w tej części umieściła informacje o udziale innych osób w poszczególnych eksperymentach, co w żadnym wypadku nie umniejsza ogromowi pracy, którą wykonała. Z rozdziału tego można też wyciągnąć informacje jakimi technikami Doktorantka posługuje się w swoich badaniach naukowych. Obejmują one m.in.:

- prowadzenie hodowli bakteryjnej w warunkach beztlenowych;
- chromatografię cieczową białek (FPLC);
- wysokosprawną chromatografię cieczową (HPLC, UHPLC) detektor DAD lub MS/MS;
- chromatografię gazową (GS-MS);
- elektroforezę żelową;
- spektrofotometrię;
- spektrofotometrię UV-Vis;
- kriomikroskopię elektronową;
- metody kwantowo-mechaniczne;

Jest to bardzo bogaty zestaw zaawansowanych metod badawczych, a każda z nich wymaga dobrego przygotowania zarówno podczas przygotowania próbek, wykonywania eksperymentów jak i analizy otrzymanych danych. We wszystkich tych aspektach Doktorantka wykazała się dużym profesjonalizmem. Uważam to za ogromny sukces Doktorantki.

Dalsza część pracy obejmująca wyniki oraz ich dyskusję została podzielona na cztery części. W części pierwszej zostały omówione aspekty dotyczące otrzymywania białka dwoma metodami, jego oczyszczania a następnie charakterystyki proteomicznej oraz oceny jego stabilności. Wyniki zostały bardzo przejrzysto i dokładnie zaprezentowane a następnie przedyskutowane w osobnym podrozdziale. Chciałam pochwalić Doktorantkę za zwrócenie uwagi na zależność pH buforu od temperatury i przedyskutowanie tego aspektu. Jest to powszechnie znana wiedza, ale często pomijana w przygotowaniach buforu co dla pH zależnych reakcji jest kluczowe.

Część druga, najbardziej rozbudowana dotyczy charakterystyki aktywności katalitycznej otrzymanych preparatów. Najpierw została omówiona aktywność AOR<sub>Aa</sub> w katalizie utleniania aldehydów na podstawie wyznaczenia specyficznej aktywności enzymu co zostało zebrane w Tabeli 12. Dla pełniejszego obrazu prowadzonych badań warto byłoby w tej tabeli umieścić również dane dla dwóch kolejnych związków tj. aldehydu octowego oraz aldehydu fenylooctowego, które wraz z aldehydem benzoowym zostały wybrane do wyznaczenia parametrów kinetycznych. Warto byłoby zaznaczyć którego z preparatów dotyczą dane, oraz



można byłoby również przytoczyć dane ze str. 64, dla drugiego z enzymów oraz dla  $\text{NAD}^+$  użytego jako kofaktora. Prace eksperymentalne wykonane przez Doktorantkę zostały wykonane w wielu warunkach, należałoby się tym pochwalić w tej części. Wszystkie parametry kinetyczne zestawiono a następnie odpowiednio skomentowano. Dużym osiągnięciem Doktorantki jest odkrycie, iż badany enzym ma aktywność hydrogenazy. Szczególnie jest to istotne w możliwości wykorzystania wodoru w reakcji redukcji  $\text{NAD}^+$ , do otrzymywania bardzo cennego  $\text{NADH}$ . W dalszej części Doktorantka scharakteryzowała aktywność badanego enzymu w katalizie redukcji kwasów karboksylowych. Zostały przeprowadzone zaawansowane badania mające m.in. na celu zrozumienie mechanizmu przebiegającego procesu w wykorzystaniem wodoru jako donora elektronów. Doktorantka pokazała, że enzym ten ma unikalną zdolność jednoczesnego katalizowania zarówno redukcji kwasu prowadzącej do otrzymania alkoholi, ale również regeneracji  $\text{NADH}$ . A testy biokatalityczne wykazały, że zaprojektowany system jest równie aktywny, jeżeli zostanie wykorzystany ekstrakt poddany jedynie ultrafiltracji, co jest istotne pod kątem wykorzystania przemysłowego. Dodatkowo Doktorantka wykazała, że  $\text{CO}$  nie hamuje aktywności hydrogenazowej, co stwarza możliwość wykorzystania jako źródła wodoru bezpośrednio paliwa gazowego zawierającego wodór (tzw. niebieskiego wodoru), który m.in. zawiera duże stężenie  $\text{CO}$ . Należy podkreślić, iż wykonane przez Doktorantkę badania mają duży potencjał wdrożeniowy i jest ona współautorem 2 zgłoszeń patentowych polskich i 1 europejskiego.

W części trzej Doktorantka opisała swoje badania dotyczące charakterystyki strukturalnej badanego enzymu. Ważnym elementem tych badań było uzyskanie odpowiedniej jakości białka potwierdzonej m.in. badaniami z wykorzystaniem fotometrii mas. Tak przygotowane białko było badane za pomocą mikroskopii cryo-EM. Wykazano, iż badany enzym jest zbudowany z trzech różnych podjednostek (AorABC) oraz potwierdzono, że  $\text{NAD}^+$  pełni rolę akceptora elektronów. Badany enzym tworzy filamenty oparte o powtarzającą się strukturę protomeru AorAB, a podjednostka AorC jest odpowiedzialna za wiązanie  $\text{NAD}^+$ . Należy tutaj podkreślić, że badania strukturalne dla bakteryjnego AOR składającego się z wielu podjednostek z wykorzystaniem techniki cryo-EM należą do pierwszych tego typu i dostarczyły wielu cennych informacji o jego strukturze.

Z kolei w czwartej części Doktorantka umieściła badania dotyczące wyjaśnienia struktury koordynacyjnej kofaktora wolframowego. Dane eksperymentalne zostały wsparte obliczeniami teoretycznymi QM oraz QM:MM. Identyfikacja ligandów wokół wolframu jest bardzo trudnym zadaniem m.in. z powodu współistnienia różnych stopni utlenienia wolframu w próbce, Doktorantka zaproponowała kilka modeli na podstawie obliczeń teoretycznych, które zostały następnie porównane z danymi z EXFAS oraz cryo-EM. Zaproponowana struktura kofaktora stała się podstawą do zasugerowania mechanizmu katalitycznego utleniania aldehydów przez  $\text{AOR}_{\text{Aa}}$ , co uważam za bardzo duże osiągnięcie Doktorantki.



Chciałam podkreślić, że otrzymane przez Doktorantkę dane eksperymentalne są bardzo starannie opracowane i opatrzone odpowiednim komentarzem. W pracy znalazło się kilka błędów edytorskich, których pozwolę sobie nie wymieniać. Na wyróżnienie zasługuje ogrom pracy włożonej przez doktorantkę w analizę otrzymanych danych oraz ich skrupulatną dyskusję. Doktorantka wykazała się tutaj dużą umiejętnością w interpretacji otrzymanych danych oraz ich wzajemnemu powiązaniu i znalezieniu pewnych korelacji. Świadczy to o Jej dojrzałości naukowej. Warsztat badawczy Doktorantki jest bardzo bogaty. Posługuje się ona bardzo zaawansowanymi technikami z dużą biegłością.

W dalszej części rozprawy doktorskiej zostało umieszczone podsumowanie, które w sposób zwięzły, ale jednocześnie dokładny przedstawia najważniejsze wnioski wyciągnięte z przeprowadzonych badań i osiągnięcia Doktorantki.

Kolejna część rozprawy to bibliografia obejmująca 196 pozycji.

Znaczna część wyników umieszczonych w pracy została już opublikowana, a więc poddana wnikliwej ocenie przez specjalistów, niewątpliwie stanowią one ceną bazę informacji na temat oksydoreduktazy aldehydów (AOR) z *Aromatoleum aromaticum*, która została dogłębnie zbadana. Z obowiązków recenzenta wymienię kilka punktów do przedyskutowania podczas obrony pracy doktorskiej.

1. Str. 120 – stabilność  $AOR_{Aa}$  określona jest na podstawie badań podjednostki AorC, która zawiera kofaktor FAD. Czy otrzymane wyniki mogą być przeniesione na całe białko? Jakie inne metody może Pani zaproponować do tego typu badań?
2. Str. 128 Tabela 14 – proszę o wyjaśnienie z czego może wynikać duża różnica w  $K_M$  dla tego samego enzymu i substratu, ale różnego akceptora elektronów.
3. Str. 142 Tabela 19 – czym Doktorantka kierowała się przy wyborze kwasu karboksylowego, czy oprócz identyfikacji produktów była określana efektywność redukcji?
4. Czy Doktorantka mogłaby przedstawić kierunki dalszych badań, które mogłyby stanowić kontynuację prac badawczych ujętych w pracy doktorskiej, czy też propozycję innych tematów badawczych, które warte byłyby zainteresowania.

Podsumowując moją ocenę rozprawy doktorskiej Pani mgr Agnieszki Winiarskiej chciałabym podkreślić wysoki poziom merytoryczny przeprowadzonych badań. Na duże uznanie zasługuje fakt, iż korzystając z doświadczenia nabytego w grupie Prof. Heidera Doktorantka część badań dotyczącej uzyskiwania enzymu w dużej skali wykonała w macierzystym Instytucie, tym samym wykazując się dużą samodzielnością i weryfikując nabyte umiejętności.



Należy zaznaczyć, iż mimo istniejących prac na temat enzymów AOR jak do tej pory nikt nie przeprowadził aż tak kompleksowych badań uwzględniających tyle różnorodnych aspektów tego zagadnienia. W tym względzie pracę Doktorantki można uznać za pionierską i niewątpliwie otrzymane dane mogą stanowić świetną podstawę do dalszych prac nad modyfikacją AOR w kierunku aplikacji w biologii syntetycznej i biotechnologii. Umiejętność sterowania parametrami kinetycznym, selektywnością a także stabilnością tego typu enzymów jest niezwykle istotne do efektywnego zastosowania ich w biokatalizie. Praca Doktorantki niewątpliwie zasługuje na najwyższe uznanie i wyróżnienie. Wyniki badań recenzowanej pracy doktorskiej zostały częściowo już opublikowane w czasopismach z listy JCR: *Chemistry- A European Journal*, *ACS Catalysis* i *Frontiers Microbiology* oraz w repozytorium *bioRxiv*. Doktorantka w trzech z nich jest pierwszym współautorem co świadczy o jej dużym zaangażowaniu w powstanie tych prac. Swoje badania Doktorantka prezentowała na licznych konferencjach krajowych jak i międzynarodowych. Dodatkowo Doktorantka uzyskała grant Preludium przyznawany w ramach konkursu organizowanego przez Narodowe Centrum Nauki oraz stypendium EMBO Scientific Exchange Grant na prace związane z doktoratem.

Ja niżej podpisana stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska Pani mgr Agnieszki Winiarskiej stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, potwierdzając wiedzę oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia badań naukowych przez Doktorantkę, zatem spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim określone w art.13 *Ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki* (Dz.U. nr 65 poz. 595 z późn. zmianami). Wnoszę więc do Rady Naukowej Instytutu Katalizy i Fizykochemii Powierzchni im. Jerzego Habera Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie Pani mgr Agnieszki Winiarskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, z uwagi na wysoką wartość merytoryczną uzyskanych wyników, omówioną przeze mnie we wcześniejszej części recenzji oraz ich opublikowanie w uznanych czasopismach, stawiam wniosek do Wysokiej Rady o wyróżnienie rozprawy.