



WYDZIAŁ BIOCHEMII, BIOFIZYKI I BIOTECHNOLOGII
ZAKŁAD BIOFIZYKI MOLEKULARNEJ
PROF. DR HAB. ARTUR OSYCZKA

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

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska Pani mgr Agnieszki Winiarskiej dotyczy badań eksperymentalnych i teoretycznych nad przedstawicielem zależnych od wolframu oksydoreduktaz aldehydu (AOR) pochodzącym z mezofilnej bakterii *Aromatoleum aromaticum*. Enzym ten, prawdopodobnie ze względu na jego niską wrażliwość na tlen, rozpatrywany jest jako biokatalizator do produkcji alkoholi i innych pochodnych aldehydów. Jak sugeruje autorka AOR do redukcji kwasów karboksylowych oprócz kompleksów metali przejściowych może wykorzystywać również elektrony z utleniania cząsteczki wodoru, co zostało wywnioskowane przez pokazanie procesu odnawiania NADH w reakcji z zależną od NADH dehydrogenazą alkoholu benzyłowego. Z drugiej strony, autorka w przeprowadzonych badaniach nie potwierdziła zaproponowanego w literaturze mechanizmu bifurkacji elektronów przez AOR. Praca przedstawia charakterystykę biochemiczną i strukturalną AOR, łączącą metody kriomikroskopii elektronowej (cryo-EM), fotometrii masowej z metodami teoretycznymi (QM i QM/MM). Niewątpliwym sukcesem autorki jest ustalenie struktury kofaktora wolframowego, w tym sposobu koordynacji wolframu w miejscu aktywnym oraz zaproponowanie ligandów, których do tej pory nie udało się dopasować na podstawie dostępnych gęstości elektronowych. W oparciu o rozwiązana strukturę kofaktora wolframowego w formie utlenionej i zredukowanej autorka zaproponowała mechanizm reakcji katalizowanej przez AOR, co wydaje się być znaczące w kontekście przemysłowej produkcji aldehydów, biorąc pod uwagę to że enzym ten wykorzystuje szeroki zestaw substratów.

Rozprawa została zredagowana w języku angielskim (zaopatrzona polskim streszczeniem) na 210 stronach maszynopisu, który podzielony został na 4 główne części: LITERATURE REVIEW (str 17-53), MATERIALS AND METHODS (str 54-110) i RESULTS AND DISCUSSION (str111-190) and SUMMARY OF THE RESULTS (str190-193).

STRESZCZENIE zawiera półtora-stronicowy opis najważniejszych elementów pracy. Jest napisane poprawnie, ale drugi akapit może sprawić trudności czytającemu odróżnienie danych literaturowych i postulowanych modeli od tych uzyskanych w badaniach przedstawionych w pracy doktorskiej.

LITERATURE REVIEW jest dość obszernym rozdziałem zapoznającym czytelnika z tematem pracy. W mojej opinii w rozdziale tym trochę za mało uwagi poświęcono strukturze miejsca aktywnego, a w
UL. GRONOSTAJOWA 7, POK. A027
30-387 KRAKÓW
TEL. +48 (12) 664 6348
EMAIL: ARTUR.OSYCZKA@UJ.EDU.PL

szczegółności konserwatywnym aminokwasom, które potencjalnie mogą pełnić rolę w wiązaniu kofaktora wolframowego i wpływać na jego geometrię i właściwości. Na końcu tego rozdziału znajdują się konkretnie sformułowane cele pracy.

Rozdział MATERIALS AND METHODS gromadzi bardzo szerokie spektrum metod i procedur zastosowanych w pracy od badań biochemicznych dotyczących ekspresji, oczyszczania, testów katalitycznych, badań spektroskopowych, po mikroskopię krioelektronową i badania teoretyczne. Rozdział ten stanowi rzetelny rezerwuar procedur laboratoryjnych, który może być wykorzystany w kolejnych badaniach nad tego typu enzymami.

Rozdział RESULTS AND DISCUSSION podzielony został na 4 podrozdziały: Part I. Enzyme preparation; PART II. Catalytic characterisation; PART III. Structural studies; PART IV. Studies of W-co, co znacznie ułatwia czytanie.

Na końcu pracy znajduje się syntetyczne podsumowanie imponującej wiedzy zdobytej podczas realizacji niniejszej pracy doktorskiej.

Do najważniejszych osiągnięć pracy zaliczyć należy:

1. Zaobserwowanie wysokiej wydajności AOR w redukcji NAD^+ , co może być wykorzystywane do odnawiania NADH w reakcjach redoks na skalę przemysłową.
2. Obalenie hipotezy o reakcji bifurkacji elektronów katalizowanej przez AOR, która została wysunięta wcześniej na podstawie obserwacji jednoczesnej redukcji kwasu benzooesowego oraz NAD^+ . Autorka pokazała że redukcja kwasu benzooesowego i NAD^+ są raczej reakcjami konkurencyjnymi katalizowanymi przez AOR, gdyż dodatek NAD^+ obniża wydajność redukcji kwasu.
3. Rozwiązanie, przy użyciu metody mikroskopii krioelektronowej, czwartorzędowej struktury kompleksu (rozdzielczość $3,3\text{\AA}$) AOR pochodzącego z *Aromatoleum aromaticum* złożonej z 6 podjednostek: $\text{Aor}(\text{AB})_2\text{C}$.
4. Zaproponowanie, na podstawie obliczeń QM/MM, sposobu koordynacji i ligandów wiążących W(VI) i W(VI), które były trudne do identyfikacji z mapy gęstości elektronowej.
5. Zaproponowanie mechanizmu redukcji kwasu benzooesowego przez AOR.

Lektura rozprawy doktorskiej nasunęła mi szereg spostrzeżeń i komentarzy do dalszej dyskusji:

1) Streszczenie pracy zawiera niejasne sformułowania:

- „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.”

Co autorka ma na myśli pisząc o bezpośredniej redukcji nieaktywowanych kwasów oraz o reakcji na niskim poziomie redoks?

- W streszczeniu wspomniany jest mechanizm bifurkacji, w której jeden elektron posłużył do redukcji kwasu benzoesowego, a drugi do redukcji NAD⁺. Nie jest to jednak jasne czy w rozważanym mechanizmie bifurkacji NAD⁺ jest wiązane przez AOR, czy też pochodzi z wspomnianego enzymu NADH-zależnej dehydrogenazy alkoholu benzyłowego (BaDH).

2) Rysunek 2 (str 24) przedstawia proces redukcji kwasu karboksylowego do aldehydu z udziałem CAR - po 1 etapie reakcji (aktywacji aldehydu) produktem powinien być jeszcze pirofosforan, skoro reakcja była z udziałem ATP.

3) Na rysunku 4 (str 29) przedstawiającym analizę filogenetyczną widnieje bardzo dużo skrótów, większość z nich w ogóle nie jest wyjaśniona w wykazie skrótów ani w tekście, np NAP/NAS, FMD/FWD, AH, FDH-H, NAR-6, TSR, PSR, itd.

4) Na stronie 30 autorka pisze: „*Most of the tungstoenzymes are involved in low-potential ($E^{\circ} < -400$ mV) electron transfer reactions with simultaneous transfer of hydrogen, oxygen or sulfur atoms. An exception here is the acetylene hydratase (structurally belonging to the DMSOR family) that catalyzes acetylene hydration and tautomerization to acetaldehyde. The oxidation- reduction reaction is catalyzed by the other members of the DMSOR family: formate dehydrogenase catalyzes the reversible conversion of formate to CO₂ at $E^{\circ} = -430$ mV and formylmethanofuran dehydrogenase is responsible for the reversible step of formylmethanofuran conversion to CO₂ and methanofuran.*”

Nie jest zrozumiałe dla czytelnika jakiego rodzaju wyjątek stanowi hydrataza acetylenu, chodzi o rodzaj przeprowadzanej reakcji?

5) Na stronie 36-37 znajduje się opis sugerowanej geometrii ligandów wolframu na podstawie EXAFS i danych krystalograficznych: „*The oxidized enzyme (with W VI) was fitted with ~3.4 of W-S bonds at 2.40 Å distance (which, according to structural data correspond to pterins), and as additional tungsten ligands: ~1.6 of W=O (oxo ligand) at 1.75 Å, and ~0.6 of W-O at 2.06 Å. The interpretation of the data for the oxidized enzyme gave the best fit for fractional coordination numbers mentioned above, which suggests that this sample consisted of a mixture of species. The reduced sample appeared to be more homogenous, as the model was fitted with one W=O at 1.75 Å, four W-S bonds at 2.39 Å (complete occupation of pterins), and one W-O at 1.97 Å. According to data from the crystal structure there is no protein-derived ligand at the tungsten coordination sphere. Therefore, the oxygen atom recognized at 1.97 Å should come from a water or hydroxo group.*”

Do tego opisu przydałby się choćby schematyczny rysunek, bo czytający ma trudności żeby sobie to wszystko wyobrazić.

6) We wstępie do pracy opisane są organizmy, w których występują zależne od wolframu oksydoreduktazy aldehydu, opisana jest ich struktura, jednak brakuje umiejscowienia tego enzymu w

komórce, czy naturalnie występuje w kompleksach z jakimiś innymi białkami, które potencjalnie mogą wpływać na zdolności katalityczne AOR?

7) W rozdziale „Electron bifurcation” (str 46-47) jako przykład enzymu katalizującego tę reakcję podany został enzym hydrogenaza [FeFe]. W tym przypadku powinno się jednak zaznaczyć, że dyskusja na temat enzymów, które mogą przeprowadzać bifurkację wywodzi się z mechanizmu bifurkacji zaproponowanego (i udokumentowanej licznymi eksperymentami) w odniesieniu do reakcji utleniania chinolu w enzymach z rodziny cytochromów *bc* (w tym mitochondrialnego kompleksu III, roślinnego cytochromu *b₆f*, bakteryjnego cytochromu *bc₁*)

8) W rozdziale „Theoretical methods” (str 103) opisany jest model kofaktora wolframowego użyty do obliczeń kwantowo-mechanicznych. Na strukturę tego kofaktora niewątpliwie wpływa oddziaływanie dwóch fosforanów pterynowych z jonem Mg^{2+} . Czy zastąpienie dwóch aminokwasów koordynujących jon Mg^{2+} cząsteczkami wody nie jest zbyt zgrubnym przybliżeniem wpływającym zarówno na strukturę jak i potencjał redoks kofaktora wolframowego. Dodatkowo w modelu QM nie ma żadnych aminokwasów oddziałujących z pterynami, podobnie jak w części QM modelu QM/MM. Warto byłoby przetestować wpływ aminokwasów występujących w sąsiedztwie kofaktora wolframowego, w tym tych koordynujących jon Mg^{2+} na jego geometrie, sposób wiązania ligandów i strukturę elektronową.

Ponadto autorka pisze: *“The overall charge of the model was -2 and calculations were conducted for a singlet state.”* Stwierdzenie to powinno być rozwinięte, brakuje podania stopnia utlenienia wolframu choćby na rysunku. Myślę, że dla odbiorcy przydatna by była również konfiguracja elektronowa jonów wolframu, gdyż nie jest to metal zbyt popularny w katalizie enzymatycznej. Rysunek 31 A) znacznie bardziej byłby pomocny, gdyby były zaznaczone formalne ładunki poszczególnych elementów modelu. Dodatkowo autorka podaje ładunek i multipletowość modelu, podczas gdy w tabeli 9 pokazuje wiele modeli nie podając informacji dla którego z tych modeli są to dane.

9) str 141-142: w rozdziale „6.4. Isotope enrichment tests” autorka pisze: *„However, the fraction is not analogous as in the reverse experiment (9.1% D₂ with H₂O suggesting deuteration in this experiment), because the enzyme is already solvated by H₂O (from stock). This reasoning leads to such hypothesis of reaction mechanism: H₂/D₂ is oxidized on W-bis-MPT cofactor and protons/deuterons are dissociated after reducing the metal from the W(VI) to the W(IV) state. Subsequently, the benzoic acid is being reduced with a transfer of hydride either bound at W-co or from protonated amino acid in the active site.”*

Jest to dość daleko posunięta hipoteza wysunięta na podstawie wyników GC-MS zebranych w tabeli 18 i wymaga szerszej dyskusji w pracy. Przydatne byłoby zrobienie obliczeń QM, aby przetestować zdolność kofaktora wolframowego do utlenienia H₂/D₂. Tabela 18 pokazuje, że najwięcej deuterowanego produktu obserwowane jest gdy zastosowano ciężką wodę (D₂O) a nie D₂ - czy to nie

jest raczej wskazówka, że protony potrzebne do redukcji kwasu benzoesowego pochodzą z wody? W strukturze z bazy PDB o kodzie: 1aor, po wyświetleniu cząsteczek wody można dostrzec kanał, prowadzący od powierzchni białka do kofaktora. Dla pH 5.6 aktywność enzymu jest znacząco wyższa niż dla pH 7.0 (tabela 17), co może wskazywać na to, że protony potrzebne do reakcji mogą pochodzić z roztworu. Niskie pH optymalne sugeruje, że kwas benzoesowy może również sprotonowany dostawać się do centrum aktywnego. Dodatkowo wykres umieszczony na Rysunku 46 B (str 145) pokazuje, że zwiększenie stężenia H₂ z 2.5% do 20%, 40% znacząco hamuje aktywność enzymu i enzym nie ulega inhibicji przez CO jak inne hydrogenazy, co raczej nie wspiera hipotezy, że kofaktor wolframowy redukuje się przez reakcje utlenienia H₂. Zastanawiające jest też po co w enzymie AOR znajduje się cały łańcuch kofaktorów pokazany na rysunku 59 skoro może pozyskiwać elektrony na miejscu z utlenienia H₂. Struktura raczej wskazuje iż rezerwuarem elektronów do redukcji wolframu jest FADH₂. Jest możliwe że w przypadku braku zewnętrznego źródła elektronów, kofaktor wolframowy w sąsiedniej podjednostce podejmuje się utlenienia H₂, ale nie jest to jasne z dyskusji przedstawionej w pracy. Czy może utlenienie H₂ zachodzi po związaniu NAD⁺ do kofaktora wolframowego, który wiąże się w przypadku niedoboru protonów w rozpuszczalniku (redukcja NAD⁺ jest efektywna w wysokim pH przeciwnie do reakcji redukcji kwasu benzoesowego, która jest najbardziej wydajna w kwaśnym pH)?

10) Na str 187 autorka pisze: *“On the other hand, the protein residues surrounding the W-co can interact with it and influence its geometry. These interactions, like hydrogen bonds, are formed during the optimization because both cofactor and neighbouring residues are flexible. However, the interactions are not necessarily present in the protein (as too many assumptions like protonation state are made during the model building and optimization) and can add error to the geometry.”*

To zdanie nie jest zrozumiałe, przecież białko ma zdolności katalityczne min. właśnie dzięki oddziaływaniom typu wiązania wodorowe.

11) Na stronie 191 autorka pisze: *„Cryo-electron microscopy investigation of AOR Aa resulted in a reconstruction of a 3.3 Å global resolution density map of seven subunits of an Aor(AB)₂C complex.”*

Jest tu pewna nieścisłość ponieważ zarówno z oznaczenia kompleksu, z opisu struktury czwartorzędowej na str 158-159 i z tabeli 23 na str 159 wynika, że kompleks Aor(AB)₂C składa się z pięciu podjednostek.

12) W załączonym wraz z pracą życiorysie naukowym Autorki podane są 4 publikacje związane z recenzowaną pracą. Zastanawia mnie czemu w samej pracy Autorka odnosi się tylko do dwóch z nich.

13) Praca zredagowana jest bardzo starannie. Z niewielu literówek jakie dostrzegłem:

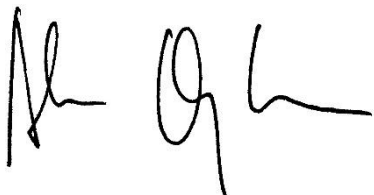
- str 123: *“Moreover, the heterologously expressed AOR Aa should be produced in larger quantities **that** a homologously expressed AOR Ae”* zamiast “that” powinno być “than”.

- str 129: „In light of this evidence, it was assumed that the observed NAD⁺ reduction is a reaction coupled to hydrogen oxidation, which **wan** not observed before for AORs. .zamiast “wan” powinno być “was”.

Opinia końcowa:

Formułując konkluzję stwierdzam, że Pani mgr Agnieszka Winiarska przedstawiła niezwykle ciekawą i obszerną rozprawę doktorską. Wyniki i ich interpretacja są nowatorskie i przyczyniają się znacząco do poszerzenia naszej fundamentalnej wiedzy na temat możliwości katalitycznych AOR wiążących kofaktor wolframowy. Badania te znacząco poszerzyły charakterystykę strukturalną, biochemiczną i katalityczną tej grupy enzymów, co ma istotne znaczenie poznawcze w sferze badań podstawowych jak i potencjalne znaczenie dla projektowania procedur produkcji aldehydów czy alkoholi na skalę przemysłową.

Mając na względzie przedstawioną powyżej opinię, uważam że prezentowana rozprawa doktorska spełnia wszystkie warunki do uzyskania stopnia doktora nauk chemicznych w zakresie dyscypliny chemia. Walory samej rozprawy, w szczególności wyjątkowa naukowa waga osiągniętych w jej ramach wyników i proponowanych mechanizmów molekularnych sprawiają, że rozprawę doktorską postrzegam jednoznacznie jako wyróżniającą. Gratulując Autorce pracy oraz Panu Promotorowi wartościowej pracy doktorskiej zwracam się z prośbą do Rady Naukowej Instytutu Katalizy i Fizykochemii Powierzchni im. Jerzego Habera Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie mgr Agnieszki Winiarskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

A handwritten signature in black ink, consisting of stylized, cursive letters. The signature appears to be 'M. G. L.' or similar, written in a fluid, connected style.