

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.

Abstract of PhD thesis of MSc Eng Agnieszka Winiarska

Tungsten-dependent aldehyde oxidoreductases (AOR) are metalloenzymes that catalyze oxidation of wide range of aldehydes. AORs are also the only enzymes that can catalyze the direct reduction of non-activated carboxylic acids to corresponding aldehydes, a low-redox reaction utilized in bacterial whole-cell systems for bioreductions to produce alcohols. AORs are mostly abundant in anaerobic, thermophilic bacteria and archaea and are highly oxygen-sensitive. In this work, a relatively oxygen-resistant AOR from the mesophilic bacterium *Aromatoleum aromaticum* (AOR_{Aa}) was characterized as a biocatalyst of high application potential for the production of bioalcohols and other aldehyde derivatives. The enzyme contains a tungsten-metallopterin cofactor in its active site within the AorB subunit, which is connected via a chain of Fe₄S₄ clusters in the AorB and AorA subunits with a FAD cofactor in the AorC subunit of the enzyme complex.

Similarly to previously characterized AORs, AOR_{Aa} was shown to reduce carboxylic acids to aldehydes when coupled with strong reducing agents (Ti(III) or Eu(II) complexes). Surprisingly, AOR_{Aa} was found to efficiently utilize the electrons from H₂ oxidation for the reduction of carboxylic acids, establishing it as a new type of hydrogenase. AOR_{Aa} was shown to reduce aliphatic, aromatic and heterocyclic acids with hydrogen as an electron donor. AOR_{Aa} demonstrated hydrogenase activity also in NAD⁺ and BV²⁺ reduction. This activity was applied as an NADH-recycling system for a cascade reaction with NADH-dependent benzyl alcohol dehydrogenase from *A. aromaticum* (BaDH). In the cascade, AOR_{Aa} simultaneously reduced NAD⁺ to NADH and benzoic acid to aldehyde, which was further converted to benzyl alcohol by BaDH at the expense of NADH. The only net reductant for bioalcohol production in this cascade was hydrogen. The simultaneous reduction of benzoate and NAD⁺ provoked a hypothesis of AOR_{Aa} utilizing electron bifurcation for the reduction of carboxylic acids, which was falsified in a series of experiments. Although the highest activity in the reduction of acid was observed at pH 5.0 and for NAD⁺ at pH 8.0, both reactions were still catalyzed at pH 7.0.

As a part of the catalytic characterization of AOR_{Aa}, apparent steady-state kinetic parameters for selected electron acceptors in aldehyde oxidation and reductions with hydrogen were determined.

Structural characterization of AOR_{Aa} was conducted within this work by cryoelectron microscopy and mass photometry. The study showed that AOR_{Aa} has an oligomeric structure of Aor(AB)_nC, with the highest observed n=5. The structural details provided by the reconstructed density map of AOR_{Aa} of 3.3 Å resolution revealed the striking structural homology of AorB with the known structure of AOR from *Pyrococcus furiosus*. The active site

cofactor in both proteins consists of tungsten, coordinated by two metalopterins and other unknown ligands, which identification is crucial for solving AOR catalytic mechanism. Since the coordination of tungsten is not possible to be unambiguously solved by X-ray diffraction or even by spectroscopic methods, theoretical methods were applied to find the most probable ligands. The QM cluster and QM:MM models of different possible coordinations were verified by comparison to the crystal structure of AOR from *P. furiosus*. The study revealed the most probable structure of the oxidized tungsten cofactor. Meanwhile, the identification of tungsten ligands in the reduced enzyme was facilitated by W L_{III}-edge EXAFS of AOR_{Aa}. The insights gained from the analysis of the binding of a benzoate molecule in the active site derived from structural data of AOR_{Aa} and the newly determined composition of oxidized and reduced structures allowed for the formulation of a new mechanistic hypothesis of AOR-catalyzed aldehyde oxidation.