

Streszczenie rozprawy doktorskiej

Syntazy X-bursztynianowe (XSS) stanowią podgrupę rodnikowych enzymów glicynowych. Enzymy te uczestniczą w inicjalizacji szlaku beztlenowej biodegradacji chemicznie stabilnych węglowodorów, takich jak toluen, metylonaftalen czy n-heksan. Aktywacja tych związków odbywa się na drodze addycji fumaranu, w wyniku której utworzone zostaje wiązanie węgiel-węgiel i powstaje produkt będący adduktem bursztynianowym. XSS są produkowane przez liczne szczepy bakterii fakultatywnie i obligatoryjnie beztlenowych, żyjących w środowiskach skażonych zanieczyszczeniami ropopochodnymi. Najlepiej poznanym przedstawicielem enzymów z grupy XSS jest syntaza benzylobursztynianowa (BSS), katalizująca addycję fumaranu do toluenu. W wyniku tej enancjoselektywnej reakcji powstaje *R*-benzylobursztynian. BSS ma strukturę heteroheksameryczną i składa się z dwóch dużych katalitycznych podjednostek α , na których to, w pobliżu C-końcowego odcinka, znajduje się rodnik glicynowy. Dodatkowo w skład heteroheksameru wchodzi po 2 mniejsze podjednostki β i γ , posiadające centra żelazowo-siarkowe, o dotychczas niewyjaśnionej funkcji.

Tematem prezentowanej rozprawy doktorskiej było scharakteryzowanie syntazy benzylobursztynianowej (BSS), na którą to składały się zarówno badania nad rekombinowaną BSS typu dzikiego oraz wybranych mutantów, produkowanych heterologicznie w komórkach *Aromatoleum evansii* KB 740, jak i BSS typu dzikiego, produkowanej naturalnie przez nowy szczep *Aromatoleum sp.*

Charakterystyka rekombinowanej BSS opierała się głównie na wyznaczeniu i porównaniu spektrum substratowego dla izozymu BSS typu dzikiego, pochodzącego ze szczepu *Thauera aromatica* K172, z mutantami Tyr197 i Arg508, w których to substytucji uległy aminokwasy uczestniczące w wiązaniu odpowiednio toluenu i fumaranu w centrum aktywnym. Efektem podstawienia Arg508 resztą Phe było zaobserwowanie nowej aktywności enzymu z acetyloakrylanem. Mutant utracił jednak zdolność do katalizy reakcji z natywnym substratem, fumaranem. Wyniki mutacji Tyr197 pokazały, że zarówno BSS typu dzikiego, jak i mutanty Tyr197Phe i Tyr197Ser mogą konwertować wszystkie trzy izomery krezoli i ksilenów. W przypadku mutantu Tyr197Ser zaobserwowano przesunięcie preferencji substratowej, gdyż mutant ten jako

jedyny wykazywał najwyższą aktywność względem *o*-ksylenu, podczas gdy typ dziki oraz mutant fenyloalaninowy wykazywały wyższe aktywności z *m*-ksylenem. Analiza bioinformatyczna tuneli wykazała, że reszta Tyr197 współtworzy jeden z kanałów stanowiących możliwe drogi transportu do centrum aktywnego BSS, jednakże nie jest ona bezpośrednio zaangażowana w budowę kanału przewidywanego jako najbardziej prawdopodobna ścieżka transportu ligandów.

BSS produkowana w nieaktywowanej formie w komórkach *E. coli* została poddana crosslinkowaniu oraz fotometrii masowej. Badanie to wykazało niestabilność BSS w formie heterohexameru, który to udało się otrzymać jedynie przy zastosowaniu wysokiego (5 mM) stężenia crosslinkera (BS3).

Pozostałe właściwości enzymatyczne BSS typu dzikiego, produkowanej przez naturalnie występujący szczep *Aromatoleum* sp. obejmowały wyznaczenie parametrów kinetycznych w stanie stacjonarnym w reakcjach z toluenem, w obecności inhibitorów (benzaldehydu oraz alkoholu benzyłowego) oraz w reakcji z analogami toluenu. Zależność aktywności BSS od stężenia toluenu została najlepiej opisana przez model Hilla, a wyznaczone parametry kinetyczne przyjęły następujące wartości: $V_{\max}=6,97 \pm 0,43$ [nmol mg min⁻¹], współczynnik Hilla (*n*)= $2,01 \pm 0,93$ oraz stałą $K'=0,25 \pm 0,04$ mM. Aktywność BSS pochodzącej z *Aromatoleum* sp. została potwierdzona z każdym z trzech izomerów krezoli i ksilenów, przy czym najwyższe aktywności zaobserwowano dla izomerów podstawionych w pozycji *orto*-.

Badania nad BSS pochodzącą z *Aromatoleum* sp. zostały poszerzone o wyznaczenie kinetycznego efektu izotopowego. Uzyskane w metodzie bezpośredniej oraz w metodzie wewnętrznej konkurencji wartości $V_{\max}$ oraz $^D\left(\frac{V}{K}\right)$ KIE wynosiły odpowiednio $2,13 \pm 0,1$ i $3,7 \pm 0,3$, co można wyjaśnić izotopowym efektem wiązania, wskazującym na lepsze wiązanie nieoznakowanego izotopowo substratu. Wymiana wodoru na deuter (HDX) na rodniku cysteinowym w trakcie powstawania produktu reakcji z d⁸-toluenem została potwierdzona poprzez wykrycie sygnałów zarówno d⁷- jak i d⁸-benzylobursztynianu. Obserwowana szybkość HDX była 17 niższa od szybkości formowania oczekiwanego produktu reakcji, d⁸-benzylobursztynianu. Wykrycie podwyższonych sygnałów dla d¹- i

d^2 -benzylobursztynianu udowodniło natomiast wymianę H/D na atomie C3' benzylobursztynianu. Wynik ten potwierdza częściową odwracalność reakcji oraz sugeruje, że wymiana ta nie jest w 100% enancjoselektywna. Dodatkowo, wymiana H/D na rodniku glicynowym była monitorowana za pomocą pomiaru EPR, który wykazał całkowitą wymianę H/D już po 30 min inkubacji enzymu w D_2O co potwierdziło wcześniejsze badania grupy prof. J. Heidera.

Abstract of PhD thesis

X-succinate synthases (XSS) form a subgroup of the glycy radical enzymes family, which initialise the biodegradation of recalcitrant hydrocarbons, such as toluene, methylnaphthalene or n-hexane. Activation of hydrocarbons is achieved by a fumarate addition, which results in C-C bond formation, yielding a succinate adduct as a product. XSS are produced in numerous facultative and obligatory anaerobic bacteria, living at the petroleum contaminated sites. These enzymes operate exclusively under an anaerobic atmosphere, as in their resting state they contain a stable glycy radical while their action involves a radical-based chemistry. The most well-known representative of XSS enzymes is benzylsuccinate synthase (BSS), which catalyses the enantioselective addition of fumarate to toluene yielding *R*-benzylsuccinate. BSS is a functional heterohexamer, comprised of two large catalytic α subunits, containing a glycy radical near the C-terminus and 4 small subunits (two β and two γ subunits) that harbour iron-sulphur clusters, which role remains elusive.

The subject of this PhD dissertation was the characterisation of BSS, including the experiments on the recombinant wild-type BSS and BSS mutants, which were produced heterologously in two strains: *Escherichia coli* BL21DE3 and *Aromatoleum evansii* KB 740 as well as the wild-type BSS produced in a native, new strain of *Aromatoleum sp.*

Recombinant BSS characterisation was mainly focused on the comparison of the substrate range of wild-type BSS, originating from *Thauera aromatica* K172, with its Tyr197 and Arg508 mutants, in which the amino acid residues involved in toluene and fumarate binding at the active site were substituted. As a result of Arg508 substitution with Phe, a new activity with acetyl acrylate was observed at the expense of the activity with the native substrate, fumarate. The results of Tyr197 substitution showed that while either the recombinant BSS and Tyr197Phe and Tyr197Ser mutants can convert all cresols and xylene isomers, the substrate preference was slightly shifted in the case of Tyr197Ser mutation. The highest activities of wild-type BSS and Tyr197Phe mutants were observed with *m*-xylene, while for Tyr197Ser the highest activity was noted with *o*-xylene. The bioinformatics analysis of tunnels revealed that while Tyr197 participates in formation of one of the plausible channels leading the way to an active site of BSS, it is

not directly involved in a formation of the channel predicted to be the most likely pathway for the ligands.

BSS, produced in a non-activated form in *E. coli* cells, was subjected to crosslinking and mass photometry measurement, which showed that the heterohexameric complex is not stable and can only be obtained by applying high (5 mM) concentrations of a suitable crosslinker (BS3).

The catalytic properties of wild-type BSS produced by *Aromatoleum sp.* were probed by the steady-state kinetics with toluene and in the presence of inhibitors (benzaldehyde or benzyl alcohol) as well as with substrate analogues. Kinetics dependence on toluene concentrations was best described with Hill model, yielding a $V_{\max}$ value of 6.97 ± 0.43 [nmol mg min⁻¹], Hill coefficient (n) of 2.01 ± 0.93 and the constant K' value of 0.25 ± 0.04 mM. The newly discovered BSS isozyme was shown to convert all cresols and xylenes isomers, with the highest activities observed with *o*-cresol and *o*-xylene. These studies were further expanded by measurements of the kinetic isotopic effect. The results obtained from the direct and competitive experiments yielded the $V_{\max}$ and $^D\left(\frac{V}{K}\right)$ KIE values of 2.13 ± 0.1 and 3.7 ± 0.3 , respectively, which can be explained by a binding isotopic effect, indicating a better binding of non-labelled substrate. Hydrogen-deuterium exchange (HDX) on thiyl radical during the product formation was confirmed by detecting both d⁸- and d⁷-benzylsuccinate signals in the reactors run with d⁸-toluene. HDX rate was determined to be 17-fold lower in comparison to the expected d⁸-benzylsuccinate formation. HDX on C3' of benzylsuccinate incubated with BSS was confirmed by the detection of increased signals originating from d¹- and d²-benzylsuccinate within [M+1-H]⁻ and [M+2-H]⁻ signals, indicating the partial reversibility of benzylsuccinate formation as well as non-absolute enantioselectivity of HDX process. Additionally, HDX on the glycy radical was monitored by EPR measurements, which proved a full protium to deuterium exchange after approx. 30 min of BSS incubation in D₂O, further confirming the previous findings reported by Prof. Heider's group.