

- 2018/31/F/NZ1/01856 [2019-2022] Struktura i funkcja enzymów glicynowo-rodnikowych katalizujących addycję do fumaranu: biochemia, modelowanie i zastosowanie - prof. M. Szaleniec

Tematem projektu jest niezwykle enzymatyczna reakcja tworzenia wiązania C-C pomiędzy węglowodorem i fumaranem w wyniku której powstaje zdefiniowany stereochemicznie addukt węglowodorowo-bursztynianowy. Została ona po raz pierwszy zaobserwowana w beztlenowych bakteriach metabolizujących węglowodory. Pierwszym opisanym przykładem tej nietypowej reakcji była addycja toluenu do fumaranu, którą katalizował enzym glicynowo-rodnikowy, syntaza benzoilobursztynianowa (BSS). Ten nowy dla biochemii proces w ciągu ostatnich lat stał się modelowym reprezentantem dla wielu innych reakcji rodnikowej addycji fumaranu katalizowanych przez analogiczne enzymy obecne w beztlenowych szlakach metabolicznych węglowodorów, zarówno z grupy związków alkiloaromatycznych jak i liniowych alkanów.

W projekcie FEARECTION przebadamy biochemię i mechanizm katalityczny całej klasy tych bakteryjnych enzymów, które nazwalismy enzymami dodającymi fumaran (FAE). FAE są wysoce wrażliwe na tlen atmosferyczny i potrzebują być aktywowane do stanu rodnikowego przez specjalny enzym aktywujący. Co więcej, wiele bakterii wytwarzających FAE dla swoich potrzeb metabolicznych rośnie bardzo powoli i wytwarza bardzo niewielkie ilości tych enzymów. Z tego powodu FAE są bardzo trudnym obiektem badań co istotnie ograniczało studia nad nimi, pomimo ich dużego znaczenia w procesach bioremediacji środowiska i ich istotnego wpływu na globalny cykl węgla. Dzięki naszemu niedawnemu odkryciu wydajnego systemu produkcji rekombinowanego enzymu BSS możliwe jest podjęcie badań proponowanych w tym projekcie. Opracowany system może zostać zaadoptowany do produkcji innych FAE w ich aktywnej formie co pozwoli po raz pierwszy badać ich biochemię.

W projekcie dwie ściśle współpracujące grupy z Niemiec i Polski będą stosowały metody kierowanej mutagenezy w celu zidentyfikowania roli poszczególnych aminokwasów w centrach enzymatycznych FAE oraz poszerzenia spektrum możliwych do otrzymania produktów. Projekt umożliwi scharakteryzowanie nowych biokatalizatorów FAE reagujących z innymi niż toluen substratami oraz pozwoli na poznanie ich struktury dzięki krystalografii rentgenowskiej. Umożliwi również badanie in-vitro procesu aktywacji FAE przez enzymy aktywacyjne. Z kolei badania nad mechanizmem reakcji będą prowadzone z wykorzystaniem zaawansowanych technik modelowania (symulacji dynamiki i obliczeń QM:MM) wspartych pomiarami eksperymentalnymi. Celem naszego projektu będzie również opracowanie biotechnologicznej metody produkcji wysokowartościowych związków syntetyzowanych z wykorzystaniem FAE w rekombinowanych systemach cało-komórkowych. Spodziewamy się, że zmodyfikowane genetycznie bakterie będą w stanie produkować chiralne związki chemiczne, które w przyszłości znajdą zastosowanie w syntezie farmaceutyków oraz jako monomery do produkcji biodegradowalnych polimerów. Wyniki projektu przyczynią się również do lepszego zrozumienia procesów bioremediacji środowiskowych zanieczyszczeń pochodzących z ropy naftowej i odpadów przemysłu chemicznego. Badania te dostarczą również istotnych danych biochemicznych ułatwiających wykorzystanie mikroorganizmów w procesie bioremediacji węglowodorów. Na koniec należy wspomnieć, że wyjaśnienie mechanizmów dla całej nowej klasy enzymów FAE przyniesie istotny wkład w dziedzinę enzymologii i biochemii procesów beztlenowych.