

- 2017/27/N/ST4/02676 [2018-2020] Wolframowa oksyreduktaza aldehydu z *Aromatoleum aromaticum* – badania mechanizmu reakcji katalitycznej – mgr A. Winiarska (dr hab. M. Szaleniec prof. IKiFP PAN)

Celem projektu jest przebadanie enzymu wolframowej oksyreduktazy aldehydu (AOR) pochodzącego z bakterii *Aromatoleum aromaticum* (AOR_{Aa}), która w warunkach beztlenowych jest zdolna do denitryfikującej degradacji szeregu związków organicznych w tym zanieczyszczeń środowiska t.j. fenole, węglowodory aromatyczne (toluen, etylobenzen), alkohole aromatyczne (np. alkohol benzyłowy) oraz aminokwasów alkilowych i aromatycznych. AOR katalizuje reakcję utleniania aldehydów do odpowiednich kwasów karboksylowych, a dotychczasowe badania enzymów występujących w *A. aromaticum* prowadzą do hipotezy, że rólą AOR w tej bakterii jest usuwanie toksycznych aldehydowych produktów ubocznych akumulujących się podczas fermentacyjnej degradacji różnych związków. Wyróżnikiem AOR z *A. aromaticum* jest jego wyjątkowa wśród wolframowych oksyreduktaz odporność na dezaktywację tlenową a bardzo skomplikowana budowa (($\alpha\gamma$)₂ β) lub ($\alpha\gamma$)₃ β) dla AOR_{Aa}, dla AOR z archaeonów α_2 .

Zaplanowane w projekcie badania dostarczą wiedzy o budowie centrum aktywnego enzymu i jego reaktywności, a dzięki temu możliwe będzie określenie mechanizmu reakcji AOR_{Aa}, co będzie głównym osiągnięciem projektu. Ze względu na podobieństwo AOR_{Aa} do innych enzymów z grupy oksyreduktaz, wiedza o budowie i mechanizmie reakcji AOR_{Aa} będzie istotna dla poznania AOR z podobnych mikroorganizmów.

Ze względu na stwierdzoną odwracalność reakcji katalizowanej przez AOR z *P. fursiosus* możliwości tego enzymu mogą pozwolić na katalizowanie redukcji kwasów karboksylowych do aldehydów. W szerszej perspektywie przeprowadzone badania mogą więc być podstawą do zastosowania AOR jako katalizatora o bardzo dużej uniwersalności do syntezy zarówno kwasów karboksylowych (z aldehydów) jak i aldehydów (z kwasów). Pozwoli to na znacznie prostszą od metod chemicznych syntezę zarówno kwasów karboksylowych jak i aromatycznych alkoholi (pod warunkiem zastosowania dodatkowego enzymu, dehydrogenazy alkoholowej, katalizującej redukcję aldehydów do alkoholi) o dużym znaczeniu przemysłowym.

Projekt będzie prowadzony w ścisłej międzynarodowej współpracy z grupą prof. Johanna Heidera z Uniwersytetu w Marburgu (Niemcy), gdzie został opracowany genetycznie zmodyfikowany szczep *A. aromaticum* o zwiększonej ekspresji AOR. W pierwszym etapie projektu zostanie przeprowadzona beztlenowa hodowla bakterii w dużej skali (100-200 l) w celu pozyskania materiału badawczego i oczyszczenie enzymu metodami chromatografii preparatywnej. Kolejnym etapem będzie strukturalna charakterystyka enzymu metodami eksperymentalnymi (krystalizacja enzymu w warunkach beztlenowych, badania rentgenograficzne oraz spektroskopia EXAFS) i teoretycznymi (modelowanie homologiczne, symulacje MD, optymalizacje geometrii metodami QM:MM). Aby możliwe było zastosowanie metod teoretycznych przeprowadzona zostanie parametryzacja siła pola siłowego AMBER dla W-Co, co w przyszłości ułatwi również symulacje dla innych enzymów wolframowych. Równoległe z badaniami strukturalnymi przeprowadzone będą badania kinetyczne, mające na celu ustalenie kinetycznego mechanizmu AOR oraz wyznaczenie stałych kinetycznych dla różnych substratów. Ten drugi aspekt dostarczy informacji o potencjalnym preferowanym przez enzym substracie (sugestia soli fizjologicznej) oraz pozwoli poznać czynniki elektronowe, steryczne i hydrofobowe wpływające na szybkość reakcji (analiza wyników kinetycznych metodą QSAR dla odpowiednio dobranych substratów). Badania kinetyczne w funkcji pH i temperatury dostarczą również informacji o potencjalnej roli katalitycznej aminokwasów kwasowo/zasadowych (Glu331 oraz His448) jak również pozwolą wyznaczyć energie aktywacji. Zgromadzone dane eksperymentalne pozwolą na sformułowanie mechanistycznej hipotezy (oraz jej wariantów) i przeprowadzenie modelowania teoretycznego metodami QM (dla niewielkich modeli klastrów reprezentujących substrat, kofaktor wolframowy i istotne otoczenie). Profile energii potencjalnej dla różnych ścieżek reakcji pozwolą wybrać najbardziej prawdopodobne mechanistyczne warianty, które zostaną dodatkowo zweryfikowane za pomocą teoretyczne obliczonych i zmierzonych eksperymentalnie kinetycznych efektów izotopowych (dla aldehydów podstawionych deuterem w pozycji α oraz znakowanej izotopowo wody).