

# Peptydowe mimetyki hydrolaz

Paweł Moráwiak

## Streszczenie

Racjonalne projektowanie sztucznych enzymów, które mogą katalizować reakcje z wydajnością i cechami porównywalną do natywnych enzymów jest niezwykle trudnym zadaniem. Wiedza z zakresu już poznanych mechanizmów reakcji oraz przykładów natywnych enzymów może stanowić cenną podstawę dla takich projektów, w których możliwe jest odtworzenie miejsca aktywnego enzymu lub wprowadzenie niebiałkowego kofaktora. Jest to możliwe gdyż ogólne mechanizmy katalizy enzymów danej klasy są bardzo zbliżone względem siebie. W literaturze istnieje niewiele przykładów udanego odtworzenia katalitycznie aktywnego mimetyku hydrolazy na niewielkim rusztowaniu peptydowym. Niemniej trudnym wyzwaniem pozostaje stworzenie mimetyku hydrolazy cysteinowej, m.in. ze względu na bardzo reaktywną naturę reszty cysteiny, która odgrywa kluczową rolę w funkcji tych enzymów.

W niniejszej pracy zaprojektowano, zsyntezowano i przebadano mimetyki hydrolaz: metalohydrolaz oraz hydrolaz cysteinowych. Peptydy i minibiałka na których oparto projektowanie nie przekraczały 50 reszt aminokwasowych i zostały zsyntezowane przy użyciu metody SPPS, oczyszczone i przebadane pod względem strukturalnym (badania CD) oraz aktywności katalitycznej (badania spektroskopii fluorescencyjnej) wobec substratów estrowych.

Pracę uszeregowano pod względem skomplikowania i wielkości minibiałkowego mimetyku enzymu. Na początku zbadano usytuowanie kluczowych reszt (cysteinowej i histydynowej) na foldamerowych, helikalnych peptydach zawierających reszty kwasu 2-amino-1-cyklopentanokarboksylowego. Następnie opracowano krótki, foldamerowy, analog palca cynkowego, który był w stanie fałdować posiadając w sekwencji wyłącznie 3 reszty koordynujące cynk. Miejsce wiązania cynku potencjalnie stanowiło analog metaloenzymu. Podobne podejście zastosowano w przypadku pracy z zastosowaniem domeny białka MvaT.<sup>1</sup> W tym małym – 43 aminokwasowym minibiałku, posiadającym dobrze zdefiniowaną strukturę trzeciorzędową, zmutowano hydrofobowe reszty rdzenia, odpowiedzialne za fałdowanie. Zastąpiono je czterema resztami zdolnymi do koordynacji jonu cynku, odzyskując tym samym wyjściową strukturę trzeciorzędową pod wpływem wiązania jonu metalu. Zsyntezowano analogi posiadające wyłącznie 3 ligandy koordynujące, jednak nie wykazywały one aktywności katalitycznej.

Domena minibiałka MvaT posłużyła również do stworzenia mimetyku hydrolazy cysteinowej: spośród 11 przykładów wbudowywania centrum aktywnego o odpowiedniej geometrii, wybrano jedno, które optymalizowano różnymi podejściami. Optymalizację katalizy przeprowadzono poprzez stabilizowanie produktów pośrednich specyficznymi grupami bocznymi reszt, zmianę globalnego momentu dipolowego niwelując naładowane reszty minibiałka oraz zwiększenie powinowactwa wobec substratu dzięki dodatkowi hydrofobowych reszt w drugiej strefie koordynacyjnej. Otrzymano ponad 1000-krotne

przyspieszenie reakcji hydrolizy względem niekatalizowanej reakcji o profilu hydrolizy enzymatycznej.

Posiłkując się metodami projektowania *in silico* zsyntezowano także 21 minibiątek zawierające różne liczby reszt kwasu 2-amino-1-cyklopentokarboksylowego. Analiza strukturalna metodą CD oraz DSC, pozwoliła na wybranie 3 przykładów przejawiających częściowe sfałdowanie. Na ich podstawie, zaproponowano kilka analogów hydrolazy cysteinowej, wbudowując przede wszystkim reszty cysteiny i histydyny. Tak stworzone mimetyki, wykazywały szybszą katalizę względem wyjściowych rusztowań.