

Streszczenie rozprawy doktorskiej

mgr inż. Katarzyna Ożga

pt. Foldamery peptydowe o aktywności aldolazowej

Promotor: dr hab. inż. Łukasz Berlicki

Jednym z wyzwań współczesnej chemii jest otrzymanie katalizatorów reakcji o właściwościach zbliżonych do natywnych enzymów, ale katalizujących reakcje nie zachodzące w naturze. Poszukiwanymi właściwościami są wysoka efektywność w warunkach normalnego ciśnienia, temperatury, czy pH oraz wysoka specyficzność reakcji, w tym stereospecyficzność. Rosnące zainteresowanie projektowaniem enzymów *de novo* jest również wynikiem coraz lepiej ugruntowanej wiedzy dotyczącej katalizy enzymatycznej oraz dostępności do wielu narzędzi projektowania *in silico*. Większość z dotychczasowych prac nad sztucznymi enzymami obejmuje jednak katalizatory otrzymane za pomocą ukierunkowanej ewolucji lub immunizacji stanem przejściowym reakcji (katalityczne przeciwciała) – czyli będące strukturalnie rozbudowanymi katalizatorami białkowymi, wrażliwymi na warunki pracy. Dużo mniej doniesień dotyczy prób racjonalnego projektowania enzymów, w tym z użyciem mniejszych niż białka rusztowań, np. foldamerów peptydowych – przyjmujących stabilne konformacje przy syntetycznie dostępnej długości sekwencji. Warto zauważyć, że mogą być one doskonałymi punktami wyjścia do wprowadzenia określonych funkcji, ponieważ ich, z założenia, zdefiniowana struktura pozwala na rozmieszczenie grup funkcyjnych w określonej geometrii.

Celem niniejszej pracy jest opracowanie racjonalnej metody otrzymania katalizatorów z wykorzystaniem foldamerów peptydowych na przykładzie mimetyków aldolazy kl. I. Wybór modelowego enzymu był głównie podyktowany dobrze poznanym mechanizmem katalizy reakcji aldolazowej, chociaż warto zauważyć, że reakcja tworzenia lub zrywania wiązania węgiel-węgiel jest użyteczna z punktu widzenia chemii syntetycznej.

Realizacja celu obejmowała: projektowanie *in silico* sekwencji peptydowych, ich syntezę na podłożu stałym, a następnie analizę konformacyjną z użyciem CD (w niektórych przypadkach też 2D NMR) oraz badania aktywności aldolazowej z użyciem fluorogennego substratu – metodolu.

Pracę podzielono na dwie części. W pierwszej konstruowano mimetyki aldolazy z użyciem usztywnionych rusztowań α,β -peptydowych zbudowanych z helis 9/10/9/12. Skonstruowano trzy różne struktury trzeciorzędowe: helisa-pętla-helisa, helisa-zwrot-helisa oraz strukturę nie spotykaną w literaturze dotyczącej foldamerów strukturę zbudowaną z trzech helis, a następnie odtworzono na nich miejsce aktywne znajdujące się natywnie w aldolazach: Lys/Glu/Lys oraz Lys/Tyr/Lys poprzez podmianę odpowiednich pozycji α -aminokwasowych w wyjściowych sekwencjach. Jeden z otrzymanych peptydów wykazywał się tysiąckrotnym przyspieszeniem reakcji aldolazowej w pH 8. Analiza zależności SAR potwierdza, że w tym przypadku kataliza jest wynikiem właściwej geometrii miejsca aktywnego, a nie jest rezultatem osiąganym poprzez eksponowanie na rusztowaniu I-rzędowych grup aminowych.

W drugiej części pracy projektowanie sztucznych aldolaz oparto na α -peptydowej strukturze C-końcowej domeny białka MvaT, która przyjmuje stabilną strukturę zawierającą dwie α -helisy oraz trzy β -harmonijki i ze względu na swoją długość – 43 aminokwasy – jest dostępna syntetycznie. Reszty katalityczne zostały wprowadzane stopniowo ostatecznie uzyskując miejsce aktywne składające się z Lys/Tyr/Tyr/Phe. Ze względu na znany mechanizm reakcji aldolazowej przeprowadzono optymalizację uzyskanego miejsca aktywnego poprzez rozmieszczenie wokół miejsca aktywnego odpowiednio naładowanych aminokwasów, mających ułatwić transfer protonu pomiędzy resztami katalitycznymi, który został rozpoznany jako etap reakcji o największej barierze energetycznej. Dwa ze zoptymalizowanych peptydów wykazywały się wysoką efektywnością. Osiągają one przyspieszenia reakcji ok. 5000. Warto zauważyć, że dotychczas nie ma w literaturze prac, gdzie zastosowano podobną racjonalną optymalizację sztucznych enzymów poprzez uwzględnienie drugiej sfery koordynacji miejsca aktywnego.