

# Metody analizy aktywności katalitycznej i projektowania biokatalizatorów oparte na teorii oddziaływań międzycząsteczkowych

Wiktor Beker

Praca doktorska wykonana pod kierunkiem  
prof. dr hab. inż. W. Andrzeja Sokalskiego

Katedra Inżynierii i Modelowania Materiałów Zaawansowanych,  
Wydział Chemiczny, Politechnika Wrocławska

## Abstrakt

Przedmiotem rozprawy jest rozwój metodologii pozwalającej ocenić wpływ mutacji na aktywność katalityczną, co ma znaczenie zarówno w procesie projektowania nowych biokatalizatorów, jak i analizy aktywności katalitycznej enzymów. Prezentowane podejście, nazwane *oddolnym* (ang. *bottom-up*), bazuje na hierarchii metod obliczeniowych zdefiniowanej przez teorię oddziaływań międzycząsteczkowych w ujęciu perturbacyjnym. Zasadniczą cechą przyjętej strategii jest jej głębokie zakorzenienie w metodologii *ab initio*, a także możliwość systematycznego prowadzenia kolejnych przybliżeń bądź poprawek, zależnie od złożoności obliczeniowej konkretnego zagadnienia. Przeciwstawiona ona jest konwencjonalnym podejściom *odgórnym* (ang. *top-down*), w których główny nacisk położony jest na uchwycenie jak największej liczby zjawisk występujących w badanym układzie (jak np. duża eksploracja przestrzeni fazowej), najczęściej za cenę wprowadzania szeregu empirycznych parametrów, co ogranicza zdolność takich modeli do ekstrapolacji opartych na nich przewidywań.

Rozdział pierwszy opisuje historię badań nad źródłami katalitycznej mocy enzymów oraz ich projektowania. Stanowi on przegląd zdobytej na przestrzeni ostatnich kilku dekad wiedzy, z uwzględnieniem najnowszych prac naukowych. Określone są tam także główne słabości stosowanych dotąd algorytmów projektowania biokatalizatorów.

W rozdziale drugim zaprezentowane są podstawy przyjętej metodologii, tj. metoda różnicowej stabilizacji stanu przejściowego (DTSS) oraz zastosowanie rachunku zaburzeń do wyznaczania energii oddziaływania pomiędzy cząsteczkami. Szczególną uwagę poświęcono oddziaływaniu elektrostatycznemu oraz jego reprezentacji w postaci pól katalitycznych i kumulatywnego atomowego rozwinięcia multipolowego (CAMM).

W rozdziale trzecim zaprezentowane są wyniki uzyskane w ramach pracy doktorskiej. Pierwsza sekcja opisuje analizę porównawczą pomiędzy różnymi reprezentacjami oddziaływania elektrostatycznego w kontekście opisu efektów katalitycznych. Pierwsza część sekcji drugiej prezentuje zastosowanie rozwinięcia multipolowego CAMM do szeregu mutantów izomerazy ketosteroidowej (KSI), co stanowiło wstępny test metody jak również jej weryfikację na przykładzie reakcji dwuetapowej. Kolejna podsekcja dotyczy teozymu KE07 oraz rodziny jego mutantów uzyskanych drogą eksperymentów kierunkowanej ewolucji. W ramach modelu wyjaśniono rolę mutacji wprowadzających aminokwasy naładowane, co nie zostało w tak szczegółowy sposób przedstawione w opublikowanych dotychczas pracach; zastosowano także bibliotekę CAMM aminokwasów białkowych, opracowaną w ramach prowadzonych badań. Oba z analizowanych przykładów pokazują bardzo dobrą zgodność modelu z danymi eksperymentalnymi, przez co stanowi on konkurencyjną alternatywę dla powszechnie stosowanych narzędzi.

Suplement pracy zawiera w pierwszej kolejności wyprowadzenia i komentarze o znaczeniu edukacyjnym. Znajdują się tam także komentarze i testy przeprowadzone w ramach prób rozbudowania metodologii DTSS, jak również testy biblioteki multipoli CAMM aminokwasów.

# Methods of analysis of catalytic activity and biocatalyst design based on theory of intermolecular interactions

Wiktor Beker

PhD thesis

supervisor: prof. dr hab. inż. W. Andrzej Sokalski

Advanced Materials Modelling and Engineering Group  
Department of Chemistry, Wrocław University of Science and Technology

## Abstract

The goal of this thesis is to develop methodology capable of prediction of the change of catalytic activity upon mutation, which is crucial for both the biocatalyst design and our understanding of existing enzymes. Presented approach, called *bottom-up*, is based on a hierarchy of computational methods defined by the perturbation theory of intermolecular interactions. Its main advantage is that it is firmly based on *ab initio* methodology, as well as a possibility for systematic incorporation of corrections and approximations, depending on the computational complexity of particular problem. This strategy is opposed to conventional, *top-down*, approaches, which are focused on description of many different phenomena (for example, an exploration of phase space), mostly at the cost of empirical parametrization decreasing the ability of the model to make extrapolated predictions.

The first chapter describes history of research on catalytic power of enzymes and their engineering. A review of the knowledge gained during past few decades, including the most recent works, is presented therein. The main disadvantages of current enzyme design algorithms and possible ways of their development are described as well.

The second chapter introduces the methodology used within work, describing Differential Transition State Stabilisation (DTSS) approach and perturbation theory of intermolecular interactions. A particular attention is paid to electrostatic interaction and its representation by means of Cumulative Atomic Multipole Moments (CAMM) and catalytic fields.

The third chapter presents the results of the research being carried out. The first section describes a comparison of different representations of electrostatic interactions in the context of description of catalytic effects. The second one contains test involving two series of mutated enzymes: one emerging from ketosteroid isomerase (KSI) and another being derived from theozyme KE07 in directed evolution experiments. In the first case, the model was successfully tested on a multistep reaction. In the second one, the detailed role of mutations introducing charged residues was revealed, which wasn't accomplished by any other work, according to the knowledge of author.; it was also an example application of CAMM library for amino acid rotamers, derived during the research. Both cases show a good agreement of model with experimental values, which justifies its possible usefulness for biocatalyst design, competitive to commonly applied protocols.

The Appendix includes supplementary figures, comments and derivations, obtained during attempts to extend the capabilities of DTSS methodology. The last part considers tests involving CAMM rotamer library.