

Magda Drewniak-Świtalska
Zakład Chemii Bioorganicznej
Wydział Chemiczny
Politechnika Wrocławska
Promotor: dr hab. inż. Łukasz Berlicki, prof. PWr

Streszczenie rozprawy doktorskiej

Projektowanie, synteza i charakterystyka trzeciorzędowych struktur foldamerów peptydowych

Cząsteczki syntetycznych foldamerów są niezwykle użyteczne w celu określenia ogólnych zasad opisujących zwijanie większych biopolimerów. Ze względu na szereg różnorodnych funkcji pełnionych w organizmach żywych, wśród biocząsteczek najbardziej istotne wydają się być białka. Ich stabilność konformacyjna w głównej mierze zależy od środowiska w jakim się znajdują – rodzaju rozpuszczalnika, pH roztworu czy obecności dodatkowych jonów. Foldamery peptydowe wykazują podobne cechy konformacyjne co naturalne białka, ale w tych cząsteczkach możliwe jest wprowadzenie dodatkowych, nienaturalnych reszt aminokwasowych, które mają za zadanie stabilizować strukturę trójwymiarową.

Najwięcej badań nad foldamerami peptydowymi dotyczy struktur drugorzędowych, a informacji na temat struktur wyższego rzędu jest zdecydowanie mniej. Nie jest to zaskakujące, ponieważ projektując struktury drugorzędowe istotne jest odpowiednie ułożenie wyłącznie szkieletu głównego, natomiast w przypadku struktur trzeciorzędowych wymagań jest zdecydowanie więcej. Przede wszystkim szkielet główny jednej cząsteczki musi przyjąć konformację co najmniej dwóch struktur drugorzędowych, a łańcuchy boczne powinny być wybrane w taki sposób, żeby było możliwe tworzenie między nimi oddziaływań stabilizujących. Zaletą foldamerów peptydowych, w porównaniu do naturalnych białek, jest możliwość wprowadzenia do sekwencji usztywnionych reszt aminokwasowych, ograniczających elastyczność szkieletu głównego, co może ułatwić projektowanie struktur wyższego rzędu.

Celem niniejszej pracy doktorskiej było opracowanie racjonalnej metodologii konstruowania rozbudowanych struktur trzeciorzędowych foldamerów peptydowych, z ukierunkowaniem sposobu zwijania się cząsteczki poprzez wprowadzenie usztywnionych reszt β -aminokwasowych. W zależności od docelowej struktury trzeciorzędowej wykorzystano dwa podejścia do projektowania sekwencji. Podejście *bottom-up* opierające się na projektowaniu *de novo* oraz *top-down* polegające na wprowadzaniu modyfikacji do sekwencji mini-białka o zdefiniowanej strukturze trzeciorzędowej.

Cel pracy podzielono na cztery cele szczegółowe:

1. Peptydy o strukturze helisa-pętla-helisa.
2. Foldamery peptydowe zawierające trzy fragmenty helikalne.
3. Peptydy o strukturze klatki tryptofanowej.
4. Peptydy o strukturze mini-białka MvaT.

Peptydy o strukturze helisa-pętla-helisa zostały zaprojektowane z wykorzystaniem metodologii *bottom-up* opierając się na danych literaturowych dotyczących 9/12/9/10-helisy foldamerowej. Otrzymano serię 8 sekwencji peptydowych, których stabilizacja konformacyjna opierała się na oddziaływaniach tworzonych między grupami na łańcuchach bocznych reszty lizyny (lub argininy) oraz kwasu glutaminowego. Jest to jeden z nielicznych przykładów foldamerów peptydowych projektowanych *de novo* o strukturze trzeciorzędowej stabilizowanej wyłącznie oddziaływaniami jonowymi.

Rozszerzając strukturę helisa-pętla-helisa, zostały podjęte próby zaprojektowania peptydów zawierających trzy struktury 9/12/9/10-helisy połączonych dwoma łącznikami. Kluczowe dla stabilności tych struktur było wprowadzenie do sekwencji helisy, aromatycznych reszt aminokwasowych tworzących hydrofobowy rdzeń cząsteczki. W wyniku projektowania opartego na intuicji chemicznej otrzymano serię 7 peptydów, jednak kontrolowanie ich konformacji okazało się niezwykle trudne, gdyż niewielka zmiana w hydrofobowym rdzeniu bądź siatki oddziaływań wodorowych, powodowała zmianę stabilności. W związku z tym, zaprojektowana została druga seria, 5 peptydów, z wykorzystaniem pakietu Rosetta. Zgodnie z oczekiwaniami, struktury o bardziej rozbudowanym hydrofobowym rdzeniu wykazywały najwyższą stabilność. Dla jednego z peptydów możliwe było wyznaczenie temperatury topnienia ($T_m = 47,9$ °C).

Kolejnym realizowanym celem było wprowadzanie reszt *trans*-(1*S*,2*S*)-ACPC do sekwencji α -helisy mini-białka klatki tryptofanowej. Przeprowadzono skan β -aminokwasowy fragmentu helikalnego (9 peptydów), dzięki któremu możliwe było zidentyfikowanie reszt istotnych dla stabilności konformacyjnej peptydu. Po wytypowaniu odpowiednich pozycji, zaproponowano sekwencje z podstawionymi dwiema lub trzema resztami *trans*-ACPC. Otrzymane peptydy wykazywały stabilność porównywalną lub wyższą w stosunku do wyjściowego mini-białka.

Ostatnią częścią badań było opracowanie analogów strukturalnych mini-białka MvaT, które we fragmentach helikalnych miały wprowadzone reszty *trans*-(1*S*,2*S*)-ACPC, z zastosowaniem motywu $\alpha\beta\alpha\alpha\beta$. Opierając się na podejściu *top-down* i używając ponownie pakietu Rosetta, zaprojektowane zostały dwie serie po 5 peptydów, ze zmienioną sekwencją fragmentu helikalnego oraz struktury hydrofobowego rdzenia. W obu seriach zidentyfikowano cząsteczki, dla których udowodniono tworzenie struktury trzeciorzędowej poprzez analizę widm CD i pomiary DSC.