



Politechnika Wrocławska

Nauki ścisłe i przyrodnicze
Nauki Chemiczne

ROZPRAWA DOKTORSKA

**Projektowanie, synteza i aktywność
minibiałek katalizujących reakcje
tworzenia wiązania węgiel-węgiel**

mgr inż. Anna Szczepańska

Promotor: prof. dr hab. inż. Łukasz Berlicki

Słowa kluczowe: minibiałka, kataliza enzymatyczna, peptydy, β -aminokwasy, projektowanie
białek *de novo*

Wrocław 2026

Serdecznie dziękuję:

prof. dr hab. inż. Łukaszowi Berlickiemu, mojemu promotorowi, za wiarę w moje możliwości, możliwość pracy przy wielu ekscytujących projektach, cierpliwość i poświęcony mi czas;

dr hab. Monice Szefczyk za umożliwienie mi pracy w prowadzonych przez nią projektach, wsparcie oraz liczne dyskusje – naukowe i nie tylko;

członkom Berlickilab, zarówno teraźniejszym, jak i poprzednim: Natalii Miodowskiej, Agnieszce Ciesiołkiewicz, Juanowi Lizandra Perez, Pawłowi Noceniowi, Violi Markovic, Kentowi Harry’emu Cumpio, Manishowi Kumar, Paulinie Macierzyńskiej, Kajetanowi Sołtysiakowi i innym – za nieocenioną pomoc, przyjaźń, współpracę;

moim kochanym rodzicom i dziadkom, którzy zawsze wierzyli we mnie i wspierali mnie bez względu na wszystko;

mojemu ukochanemu Kubie, dzięki któremu jestem w stanie mierzyć się z wszelkimi trudnościami.

SPIS TREŚCI

1. WSTĘP	11
1.1. Wyzwania w projektowaniu katalizy enzymatycznej	11
1.2. Ukierunkowana ewolucja	13
1.3. Przeciwciała katalityczne	13
1.4. Racjonalne projektowanie enzymów	14
1.4.1. Metody projektowania enzymów <i>de novo</i>	15
1.4.2. Retroaldolazy	25
1.5. Minibiałka	30
1.5.1. Natywne minibiałka	31
1.5.2. Minibiałka zaprojektowane <i>de novo</i>	35
1.6. Minibiałka katalityczne	43
2. CEL PRACY	48
3. WYNIKI I DYSKUSJA	49
3.1. Mechanizm reakcji	49
3.2. Katalizatory bazujące na domenie MvaT	53
3.2.1. Wtórne wykorzystanie retroaldolazy MvaT	53
3.2.2. Wybór nowego miejsca aktywnego	60
3.2.3. Mutacje w pobliżu miejsca aktywnego	67
3.2.4. Druga iteracja mutacji w pobliżu miejsca aktywnego	75
3.2.5. Modulacja ładunków na powierzchni	79
3.2.6. Podsumowanie	84
3.3. Minibiałka <i>de novo</i> o topologii HHEEE	85
3.3.1. Projektowanie	85
3.3.2. Analiza strukturalna	86
3.3.3. Poprawienie charakterystyki strukturalnej	88
3.3.4. Druga iteracja optymalizacji	93
3.3.5. Wybór położenia tyrozyny	102
3.3.6. Dobór reszty w pozycji 41	106
3.3.7. Optymalizacja rozkładu ładunków	110
3.3.8. Weryfikacja miejsca aktywnego	117
3.3.9. Wydłużenie pętli	121
3.3.10. Zmniejszenie symetrii β -kartki	125
3.3.11. Podsumowanie	128
3.4. Minibiałka <i>de novo</i> o topologii HEEEH	130
3.4.1. Projektowanie	130
3.4.2. Analiza strukturalna	132
3.4.3. Aktywność katalityczna	135
3.4.4. Połączenie cech minibiałek o najlepszej charakterystyce	137
3.4.5. Optymalizacja rozkładu ładunków	142

3.4.6.	Dodatkowe mutacje w pierwszej i drugiej sferze koordynacji	151
3.4.7.	Podsumowanie	157
3.5.	Porównanie z L-proliną	158
4.	PODSUMOWANIE	159
5.	CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA	160
5.1.	Odczynniki	160
5.2.	Komputerowo wspomagane metody projektowania	160
5.2.1.	Protokół BluePrint oprogramowania Rosetta	161
5.2.2.	Protokół FastDesign oprogramowania Rosetta	162
5.2.3.	Wykorzystanie Alphafold w projektowaniu minibiałek	163
5.2.4.	Dynamika molekularna	163
5.3.	Synteza peptydów	163
5.3.1.	Synteza przy użyciu automatycznego syntezyzatora	164
5.3.2.	Odcinanie peptydów z żywicy	165
5.3.3.	Oczyszczanie peptydów	165
5.3.4.	Identyfikacja produktu	165
5.4.	Dichroizm kołowy	166
5.4.1.	Pomiar widm CD w stałej temperaturze	166
5.4.2.	Pomiary temperaturowe CD	166
5.5.	Pomiary nanoDSF	167
5.6.	Pomiary spektroskopii NMR	167
5.6.1.	Tabele	167
5.7.	Pomiary aktywności katalitycznej	179
5.8.	Charakterystyka związków	181
6.	BIBLIOGRAFIA	184

STRESZCZENIE

Pomimo rosnącego zainteresowania zieloną chemią i katalizą enzymatyczną, szerokie zastosowanie biokatalizatorów w przemyśle wciąż jest ograniczone. Wynika to głównie z wąskiego spektrum katalizowanych przez nie reakcji oraz ich wysokiej wrażliwości na czynniki zewnętrzne, takie jak pH czy temperatura. Nowoczesne metody projektowania i inżynierii białek pozwalają jednak na tworzenie wysoce wydajnych katalizatorów dedykowanych konkretnym reakcjom, zdolnych do pracy w łagodnych warunkach.

W tym kontekście szczególnie obiecującą grupę związków stanowią minibiałka. Są to polipeptydy o masie cząsteczkowej poniżej 10 kDa, charakteryzujące się dobrze zdefiniowaną i wysoce stabilną strukturą trzeciorzędową. Dzięki podatności na projektowanie *de novo*, umożliwiają one uzyskanie topologii niewystępujących w naturze. Te cechy czynią je doskonałymi rusztowaniami do wprowadzania funkcjonalnych reszt aminokwasowych.

W niniejszej pracy zbadano dwie strategie projektowania aktywnych katalitycznie minibiałek zdolnych do promowania reakcji aldolowej pomiędzy 4-nitrobenzaldehydem a fenyloacetaldehydem.

W pierwszym etapie badań reszty katalityczne – lizyna oraz tyrozyna – zostały wprowadzone do naturalnego minibiałka **MvaT**. Przeanalizowano 15 różnych kombinacji ich ułożenia, żeby wybrać najbardziej efektywną architekturę centrum aktywnego. Najlepszy wariant został następnie zoptymalizowany iteracyjnie, osiągając 1700-krotne przyspieszenie reakcji.

Równolegle prowadzono prace nad projektowaniem minibiałek *de novo*, do których helis wprowadzono cykliczny β -aminokwas (*trans*-ACPC), który usztywnia strukturę i promuje jej zwijanie. Konstrukcja zupełnie nowych struktur pozwoliła na znaczne zwiększenie zestawu dostępnych rusztowań. Sekwencje wygenerowano przy użyciu oprogramowania Rosetta. Peptydy syntetyzowano na podłożu stałym, a analizę strukturalną oparto na metodach dichroizmu kołowego i różnicowej fluorymetrii skaningowej (nanoDSF), a dla wybranych związków wykonano pomiary 2D NMR. W rezultacie otrzymano dwie klasy wysoce stabilnych minibiałek o odmiennych

topologiach: HHEEE (helisa-helisa- β -kartka) oraz HEEEH (helisa- β -kartka-helisa). W wyniku racjonalnie dobranych mutacji najbardziej obiecujących wariantów otrzymano minibiałka zdolne do 3000-krotnego przyspieszenia reakcji, a efektem badań strukturalnych jest częściowo rozwiązana struktura jednego z nieaktywnych rusztowań.

Przeprowadzone badania nie tylko pogłębiają zrozumienie zależności między strukturą a aktywnością minibiałek w reakcjach wykraczających poza modelowe zestawy substratów, ale również stanowią kolejny krok w kierunku opracowania efektywnej metodologii projektowania katalizatorów o wyjątkowych właściwościach.

ABSTRACT

Despite the growing interest in green chemistry and enzymatic catalysis, the widespread industrial application of biocatalysts remains limited. This is primarily due to the narrow spectrum of reactions they catalyze and their high sensitivity to factors such as pH and temperature. However, modern protein design and engineering methods allow for the creation of highly efficient catalysts dedicated to specific reactions, capable of operating under mild conditions.

In this context, miniproteins represent a particularly promising group of compounds. These are polypeptides with a molecular weight below 10 kDa, characterized by a well-defined and highly stable tertiary structure. They can be also designed entirely *de novo*, leading to development of topologies not found in nature. These features make them excellent scaffolds for introducing functional amino acid residues.

In this work, two strategies for designing catalytically active miniproteins capable of promoting the aldol reaction between 4-nitrobenzaldehyde and phenylacetaldehyde were investigated.

In the first stage of the research, catalytic residues — lysine and tyrosine — were introduced into the natural miniprotein **MvaT**. 15 different combinations of their arrangement were analyzed to select the most effective active site architecture. The best variant was then iteratively optimized, achieving a 1700-fold reaction acceleration.

In parallel, work was carried out on the *de novo* design of miniproteins, into whose helices a cyclic β -amino acid (*trans*-ACPC) was introduced, which rigidifies the structure and promotes its folding. The construction of completely new structures expanded the set of available scaffolds. The sequences were generated using Rosetta software. The peptides were synthesized on a solid support, and the structural analysis was based on circular dichroism and nano-differential scanning fluorimetry (nanoDSF) methods, with 2D NMR measurements performed for selected compounds.

As a result, two classes of highly stable miniproteins with distinct topologies were obtained: HHEEE (helix-helix- β -sheet) and HEEEH (helix- β -sheet-helix). Through rationally selected mutations of the most promising variants, miniproteins capable of

a 3000-fold reaction acceleration were obtained, and the structural studies resulted in a partially solved structure of one of the inactive scaffolds.

The conducted research not only deepens the understanding of the relationship between structure and activity of miniproteins in reactions extending beyond model substrate sets, but also represents another step toward developing an effective methodology for designing catalysts with exceptional properties.

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

ACN	acetonitryl
CD	dichroizm kołowy (ang. <i>Circular Dichroism</i>)
DCM	dichlorometan
DIC	N,N'-diizopropylkarbodiimid
DMF	N,N-dimetyloformamid
Fmoc	grupa fluorenylometoksykarbonylowa
HPLC	wysokosprawna chromatografia cieczowa
MS	spektrometria mas
NMR	spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego
TFA	kwas trifluorooctowy
TIS	triizopropylsilan
T_M	temperatura denaturacji (ang. <i>melting temperature</i>)
<i>trans</i> -ACPC	kwas (1S,2S)- <i>trans</i> -aminocyklopentanokarboksylowy
TS	stan przejściowy (ang. <i>transition state</i>)
DE	ukierunkowana ewolucja (ang. <i>Directed Evolution</i>)
AI	sztuczna inteligencja (ang. <i>Artificial Intelligence</i>)
PCR	reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
RA	retroaldolaza (ang. <i>Retroaldolase</i>)
KE	eliminaza Kempa (ang. <i>Kemp Eliminate</i>)
QM	mechanika kwantowa (ang. <i>Quantum Mechanics</i>)
MD	dynamika molekularna (ang. <i>Molecular Dynamics</i>)
RMSD	średnie odchylenie kwadratowe (ang. <i>Root Mean Square Deviation</i>)
RMSF	średnia fluktuacja kwadratowa (ang. <i>Root Mean Square Fluctuation</i>)
KPB	bufor fosforanowy
C_{sub1}	stężenie substratu 1
nanoDSF	różnicowa fluorymetria skaningowa (ang. <i>nanoDifferential Scanning Fluorimetry</i>)
HHEEE	helisa-helisa- β -kartka (ang. <i>Helix-Helix-Extended-Extended-Extended</i>)
HEEEH	helisa- β -kartka-helisa (ang. <i>Helix-Extended-Extended-Extended-Helix</i>)

1. WSTĘP

W naturze większość reakcji jest katalizowana przez enzymy, dzięki czemu ich szybkość zwiększa się co najmniej miliony razy.^{1,2} W molekularnie zatłoczonym środowisku komórkowym kluczowa jest specyficzność i selektywność, które wykazują aktywne katalitycznie białka. Wysoki poziom wyspecjalizowania enzymów wynika z ich niesamowitej różnorodności; dzięki złożonej strukturze trzeciorzędowej, ogromnej liczbie sekwencji możliwych do utworzenia z naturalnych aminokwasów, a tym samym zróżnicowanego środowiska reakcyjnego. Chiralne miejsca aktywne zapewniają odpowiednie warunki reakcji, umożliwiając jednocześnie bliski kontakt między substratami oraz ich precyzyjne orientowanie w taki sposób, aby reakcja zachodziła z wysoką stereo- i regiospecyficznością.³ Jak wszystkie katalizatory stabilizują one stan przejściowy (TS) i obniżają energię aktywacji reakcji.^{4,5} W tym celu często wykorzystywane są naładowane grupy funkcyjne aminokwasów lub skoordynowane jony metali, które umożliwiają transport i tunelowanie protonów, tworzą ukierunkowane oddziaływania elektrostatyczne i wiązania wodorowe oraz wpływają na środowiskowo modulowane zmiany pK_a reszt aminokwasowych.⁵

Ze względu na wysoką aktywność i produkcję związków czystych optycznie, enzymy mają ogromny potencjał przemysłowy. Ich zastosowanie jest jednak ograniczone przez wąski zakres katalizowanych reakcji, specyficzne wymagania dotyczące optymalnych warunków działania oraz podatność na denaturację w obecności organicznych rozpuszczalników lub w wysokiej temperaturze.⁶ Aby w pełni wykorzystać ich możliwości, enzymy mogą być modyfikowane w celu dostosowania ich właściwości do określonych procesów chemicznych. Obecnie w inżynierii enzymów stosuje się dwa główne podejścia: racjonalne projektowanie oraz ukierunkowaną ewolucję (ang. *directed evolution*, DE).⁷

1.1. Wyzwania w projektowaniu katalizy enzymatycznej

Wyjątkowa złożoność procesów katalitycznych w organizmach żywych przekłada się na trudności w odwzorowaniu ich przez człowieka poza warunkami fizjologicznymi i w zrozumieniu zasad leżących u podstaw ich wyjątkowej wydajności.

Białka są strukturami dynamicznymi, poddanymi ruchom w różnych skalach czasowych: od fluktuacji termicznych, ruchów grup bocznych reszt aminokwasowych, po dynamikę pętli i zmiany konformacyjne. Wszystkie te procesy mogą mieć kluczowe znaczenie dla katalizy. Większość modeli białkowych to z kolei modele statyczne, nie odzwierciedlające zbioru wszystkich występujących konformacji (ang. *ensemble*), które istnieją w roztworze jednocześnie.⁸ Metody traktujące białko jako jedną, nieruchomą strukturę, są więc obarczone błędem.⁹

Ponadto, znaczna część nowo zaprojektowanych enzymów nabywa aktywność katalityczną poprzez wprowadzenie mutacji w znanym rusztowaniu białkowym. Każda mutacja może w rzeczywistości doprowadzić do przesunięcia się reszt aminokwasowych względem modelu, dopuszczając do zerwania sieci wiązań wodorowych, oddalenia od siebie donora i akceptora, braku dostępności miejsca aktywnego dla substratu czy wpuszczenia do niego cząsteczek wody. Efekty mutacji mogą być trudne do przewidzenia, ponieważ nawet znacznie oddalone reszty aminokwasowe biorą udział w stabilizacji aktywnej konformacji białka i mogą wpłynąć na liczbę obrotów enzymu.^{10,11}

Kluczowe jest także zapewnienie odpowiedniego środowiska reakcji, a szczególnie preorganizacja miejsca aktywnego, która umożliwia stabilizację stanu przejściowego i wymusza postęp reakcji. Problem staje się wyjątkowo złożony dla reakcji wieloetapowych, w których miejsce aktywne musi odpowiadać na zmiany zachodzące w trakcie kolejnych etapów.

Obecnie mamy do czynienia z intensywnym rozwojem metod komputerowego projektowania enzymów. Niemniej jednak są one ograniczone przez dostępność zasobów obliczeniowych oraz czas symulacji. Dodatkową barierę stanowi niekompletność baz danych, a w tym braki w raportowaniu negatywnych wyników. Ich analiza pozwala na ulepszenie projektowania i filtrowania uzyskanych wyników; są one także kluczowe do trenowania metod AI.⁶

1.2. Ukierunkowana ewolucja

Mnogość efektów wpływających na katalizę i jej relacja ze stabilnością i zwijaniem się białek powoduje, że wiodącą metodą inżynierii enzymów jest ukierunkowana ewolucja. Enzymy zdolne do katalizowania dodatkowych reakcji ubocznych (ang. *promiscuous enzymes*) są poddane przypadkowym mutacjom, a spośród powstałych mutantów wybiera się te o pożądanych cechach. Metody takie jak PCR podatny na błędy (ang. *error-prone PCR*), mutageneza nasycająca (ang. *site-saturation mutagenesis*) lub tasowanie DNA (ang. *DNA shuffling*) są wykorzystywane do generowania biblioteki genów o zwiększonej różnorodności, następnie ulegają klonowaniu i ekspresji, a w końcu selekcji na podstawie pożądanych cech.¹² Wybrane warianty podlegają kolejnej mutagenezie, a proces powtarza się w wielu iteracjach. Możliwe jest także podejście częściowo racjonalne, różniące się pierwszym etapem – biblioteka genów tworzona jest na podstawie znajomości okolicy miejsca aktywnego i wybranych mutacji punktowych (ang. *site-directed mutagenesis*).

Ograniczenia tej metody są jednak znaczące: po pierwsze, ogranicza zakres możliwych do osiągnięcia reakcji i wymaga praco- i czasochłonnego *screeningu*. Ukierunkowana ewolucja może zostać wykorzystana do zwiększenia aktywności zaprojektowanych racjonalnie enzymów, ale sama w sobie nie wymaga zrozumienia efektów katalitycznych. Po drugie, w praktyce zakres reakcji, które mogą być katalizowane, ogranicza się do tych, które są już przynajmniej częściowo katalizowane przez dane białko. Pojawienie się zupełnie nowej funkcji wymagałoby zbyt wielu iteracji. Niemniej stanowi istotne źródło do analizy przyczyn, dla których poddane DE białko nie było w pełni sukcesem. Nie wymaga ona także znajomości struktury wybranego białka ani jego miejsca aktywnego.

1.3. Przeciwciała katalityczne

Łatwo zauważyć podobieństwa między immunoglobulinami a enzymami. Przeciwciała korzystają z tych samych typów oddziaływań i strukturalnego dopasowania do wiązania różnego rodzaju cząsteczek, a na ich powierzchni można znaleźć wnęki i kieszenie.¹³ W 1969 roku W. P. Jencks zaproponował, że możliwe jest stworzenie katalitycznych przeciwciał (abzymów), używając jako haptenu analogów stanu

przejściowego. Podejście to było bardzo popularne w latach 80. ubiegłego wieku, jednak pomimo uzyskania abzymów zdolnych do katalizowania wielu nienaturalnych reakcji chemicznych, nie udało się otrzymać wartości k_{cat}/K_M na satysfakcjonującym poziomie – takim, jakie wykazują natywne enzymy. Otrzymane przeciwciała przyspieszały reakcje $10^3 - 10^5$ -krotnie.¹³

Pierwszym problemem jest dobranie analogu stanu przejściowego, co wymaga nie tylko znajomości mechanizmu reakcji, ale także trafnego wyboru cząsteczki naśladującej TS. Wiązanie TS lub produktów przejściowych reakcji zbyt mocno może spowolnić lub uniemożliwić postęp reakcji; powtarzającym się problemem w przeciwciałach katalitycznych jest inhibicja produktami.⁷

Warto pamiętać, że kluczem do działania enzymów nie jest jedynie stabilizacja stanu przejściowego – jest to także związana z miejscem aktywnym dynamika, destabilizacja stanu podstawowego oraz inne efekty, których brakuje w abzymach. Najprawdopodobniej zbyt duża sztywność przeciwciał negatywnie wpływa na efekt katalityczny.

1.4. Racjonalne projektowanie enzymów

Racjonalne projektowanie enzymów wymaga zaawansowanego zrozumienia relacji pomiędzy sekwencją, strukturą a funkcją białek. Z tego powodu podejście może uwydatniać luki w naszej wiedzy, a niespodziewane wyniki badań często prowadzą w kierunku bardziej kompletnego obrazu katalizy enzymatycznej. Metodologia opiera się na logicznie wybranych mutacjach, których kolejne iteracje wynikają bezpośrednio z walidacji eksperymentalnej. Pomimo ogromu danych na temat białek istniejących w naturze, ich skomplikowanie i złożoność utrudniają przełożenie wiedzy na projektowanie. Ponadto przewidywanie oddziaływań dalekiego zasięgu i dynamiki białek stanowi istotne wyzwanie. Mimo tych ograniczeń, wraz z rozwojem bioinformatyki, dostępności zasobów obliczeniowych i ilości dostępnych danych strukturalnych dotyczących różnorodnych białek, racjonalne projektowanie enzymów przynosi coraz więcej sukcesów. Najtrudniejszym zadaniem jest wprowadzenie aktywności do zupełnie nieaktywnych rusztowań białkowych – czyli projektowanie *de novo*.

1.4.1. Metody projektowania enzymów *de novo*

Najpopularniejsze podejście do projektowania enzymów polega na przeniesieniu miejsca aktywnego znanego enzymu do innego białka, którego geometria na to pozwala.¹⁴ W ten sposób poprawione mogą być charakterystyka fizykochemiczna enzymu, jego stabilność, a co za tym idzie — potencjalne zastosowanie. Jest to także istotnym źródłem wiedzy na temat mechanizmu katalizy i warunków wymaganych do jej odtworzenia. Projektowanie *de novo* zaczyna się krok wcześniej, od zaprojektowania samego miejsca aktywnego, dzięki czemu możliwa jest kataliza nienaturalnych reakcji.

Projektowanie miejsca aktywnego wymaga zrozumienia mechanizmu, według którego zachodzi modelowana reakcja.¹⁵ Na tej podstawie można zbudować enzym teoretyczny, czyli teozym, który obejmuje łańcuchy boczne reszt aminokwasowych zaangażowane w katalizę i stan przejściowy, ułożone w idealnej geometrii.^{14,15} Dostępne w bazach danych struktury białkowe przeszukuje się pod kątem komplementarności geometrycznej. Zdarza się także, że idealne dopasowanie nie zostaje znalezione. Lepszym rozwiązaniem wydaje się więc zbudowanie rusztowania „wokół” teozymu – nie jest to jednak trywialnym problemem i podlega dodatkowym wyzwaniom projektowania białek od podstaw. Takim rozwiązaniem można nazwać minimalistyczne podejście, według którego zaprojektowano np. minibiałkowy mimetyk anhidrazy węglanowej o topologii ABB.¹⁶ W ostatnich latach rozwinięto także metodologie oparte na sieciach neuronowych, umożliwiające generowanie rusztowań wokół podanego motywu.¹⁷

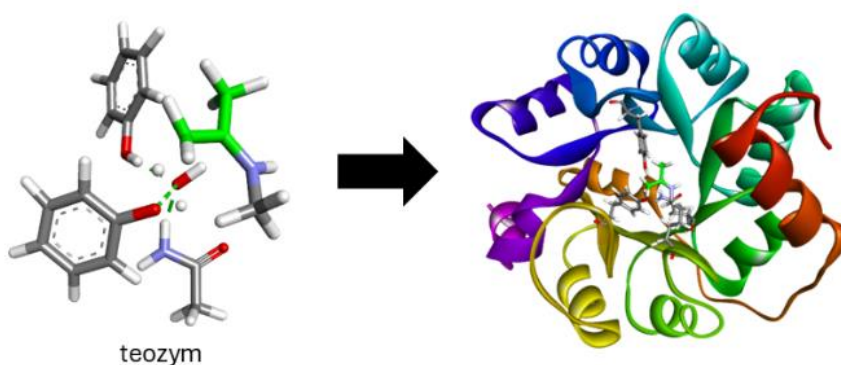
1.4.1.1. Umieszczenie teozymu w znanym rusztowaniu białkowym

W 2008 roku opublikowane zostały zestawy sztucznych enzymów o aktywności retroaldolazowej (ang. *retroaldolase*, RA) i eliminazy Kempa (ang. *Kemp Eliminate*, KE).¹⁸ Choć niektóre z nich wykazywały aktywność katalityczną, nie udało się uzyskać wydajności zbliżonej do naturalnych enzymów. Do jej poprawienia konieczne było zastosowanie metod ukierunkowanej ewolucji. Niesatysfakcjonujące wyniki wskazują na to, że nie wszystkie elementy wpływające na katalizę zostały wzięte pod uwagę.¹⁴ Badania te można jednak uznać za dobry punkt startowy.

Pierwszym krokiem opisanego protokołu jest wykorzystanie obliczeń mechaniki kwantowej (ang. *quantum mechanics*, QM) do analizy mechanizmów reakcji

i skonstruowania teozymu. Następnie wykorzystuje się algorytmy takie jak SABER¹⁹ czy RosettaMatch²⁰, żeby znaleźć dla niego odpowiednie rusztowanie (rysunek 1). Baza danych zawierająca różne białka jest przeszukiwana pod kątem podobieństwa w poszukiwaniu takich struktur, w których możliwe jest spełnienie geometrii miejsca aktywnego.^{18,7}

W kolejnym etapie część sekwencji białka podlega optymalizacji. Zazwyczaj obejmuje to pierwszą powłokę koordynacji (ang. *first coordination shell*), co umożliwia związanie substratów, utworzenie się odpowiedniej wnęki i odpowiednie zorientowanie łańcuchów bocznych katalitycznych reszt aminokwasowych. W tym celu można wykorzystać pakiet oprogramowania *Rosetta*. Najlepsze wyniki są wybrane do walidacji eksperymentalnej na podstawie wybranej funkcji oceniającej.¹⁸



Rysunek 1. Wprowadzenie teozymu do rusztowania białkowego na przykładzie retroaldolazy.

W przypadku eliminazy Kempa, zaprojektowany i zoptymalizowany z wykorzystaniem obliczeń QM teozym wprowadzono do różnych rusztowań, korzystając z algorytmu *RosettaMatch*, a następnie przeprojektowano reszty aminokwasowe w jego pobliżu (z wykorzystaniem *Rosetty*).¹⁸ Najlepsze modele wybrano na podstawie geometrii miejsca aktywnego i obliczonej energii wiązania stanu przejściowego. Do walidacji eksperymentalnej wybrano 59 projektów opartych na 17 różnych rusztowaniach białkowych. Spośród nich 8 wykazywało aktywność katalityczną. Jeden z nich stanowiła eliminaza **KE59**, bębenek TIM (ang. *TIM barrel*) z katalityczną resztą glutaminianu w hydrofobowej wnęcie. Stabilizację stanu przejściowego osiągnięto

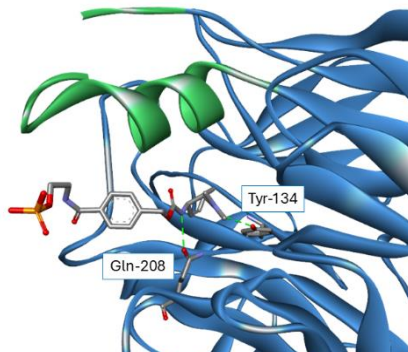
dzięki oddziaływaniom π - π z resztą tryptofanu i wiązaniami wodorowym między pobliskimi serynami a grupą NO_2 .

Wcześniejszy analog, **KE07**, został wybrany do dalszych badań, ponieważ otrzymano dla niego strukturę krystaliczną. Na jej bazie oceniono, że projektowe ułożenie miejsca aktywnego bazującego na glutaminianie zostało zachowane. Białko **KE07** zostało poddane 7 rundom DE, w wyniku czego nie doszło do zmian w obrębie reszt katalitycznych, a jedynie w ich sąsiedztwie. W rezultacie pK_a reszty Glu wzrosło z 4,5 do 5,9, a k_{cat}/K_M – 200-krotnie.

Standardowy protokół projektowania enzymów *de novo* z wykorzystaniem pakietu *Rosetta* (*RosettaMatch*, *RosettaDesign*) zastosowano także do otrzymania białek **DA_20_00** i **DA_42_00**, które wykazały zdolność do katalizowania reakcji Diels-Aldera między karbaminianem *trans*-1,3-butadien-1-ylu 4-karboksybenzylowego a N,N-dimetyloakrylamidem.²¹ **DA_20_00** wybrano do dalszej optymalizacji okolic miejsca aktywnego. Wprowadzenie sześciu dodatkowych mutacji poprawiło upakowanie i komplementarność elektrostatyczną względem związanych substratów. Otrzymany wariant, **DA_20_10**, katalizował reakcję z efektywną molarnością 89 M. Ponadto enzym ten prowadził do powstania produktu *3R,4S* z wysoką selektywnością stereochemiczną (>97%) i silnie preferował substrat, dla którego został zaprojektowany – nawet małe zmiany powodowały znaczny spadek aktywności.

Jedną z hipotez dotyczących niskiej aktywności katalitycznej **DA_20_10** było zbyt duże wyeksponowanie miejsca aktywnego do rozpuszczalnika. Użytkownicy gry online *FoldIt* zaprojektowali więc mutant, który zawiera przykrywkę w postaci motywu helisa-zwrot-helisa.^{22,23} Dzięki większemu obudowaniu wnętrza otrzymany wariant – o nazwie **C6** – osiągnął znacznie lepsze wartości K_M . Parametr k_{cat} pozostał jednak taki sam.

Kombinacja mutacji otrzymanych w wyniku PCR podatnego na błędy (wariant **DA_20_20**) i zmian wprowadzonych przez użytkowników gry *FoldIt* (wariant **CE6**) poskutkowała nową Diels-Alderazą, **CE11** o parametrach kinetycznych o wartościach pomiędzy jej prekursorami. Udało się je poprawić przez osiem kolejnych rund DE. Ostatecznie otrzymano wariant **CE20** (rysunek 2) o EM równym 478 M, dla którego uzyskano strukturę krystaliczną (**PDB ID: 4O5T**).²⁴



Rysunek 2. Struktura krystaliczna Diels-Alderazy **CE20** z analogiem produktu (**PDB ID: 4O5T**). Kolorem zielonym zaznaczono motyw helisa-zwrot-helisa dodany przez użytkowników *FoldIt*. Reszty aminokwasów Tyr-134 i Gln-208 wchodzą w skład teozymu, a zielone przerywane linie symbolizują wiązania wodorowe pomiędzy nimi a ligandem.

1.4.1.2. Energia reorganizacji

Nieosiągnięcie wyników porównywalnych z naturalnymi enzymami sprawiło, że zaczęto myśleć nad rozszerzeniem protokołu o uwzględnienie większej liczby efektów biorących udział w katalizie.²⁵ Podstawowym pojęciem w kontekście katalizy enzymatycznej jest energia reorganizacji miejsca aktywnego.

W trakcie przebiegu katalizowanej reakcji zmienia się rozkład ładunków; otoczenie musi więc jakoś odpowiedzieć na tę zmianę. Kiedy reakcja zachodzi w wodzie, cząsteczki wody muszą się obrócić, co wymaga nakładu energii. Energia, która jest potrzebna do przearanżowania enzymu w trakcie przebiegu reakcji, powinna być jak najniższa – dlatego enzym powinien być zorganizowany od razu w taki sposób, żeby odpowiadać rozkładowi ładunków stabilizującym stan przejściowy.¹⁴

W 2014 roku zaproponowano schemat działania przy projektowaniu enzymów *de novo* uwzględniający ocenianie najlepszych rusztowań białkowych pod względem globalnej energii reorganizacji. Uwzględnienie tego na tak wczesnym etapie ułatwiłoby dalsze optyimizacje. Energia preorganizacji może zostać obliczona przy użyciu metody *Empirical Valence Bond* (EVB), *Free Energy Perturbation*, *Umbrella Sampling*, a także *Linear Response Approximation*.²⁵ EVB zostało zastosowane do badań nad eliminazami Kempa, w szczególności **KE07**.¹⁵ Wywnioskowano, że trudności w zaprojektowaniu wydajnej eliminazy wynikają z małej zmiany w rozkładzie ładunków w trakcie tworzenia się stanu przejściowego. Dodatkowo, otrzymane wcześniej eliminazy (poddane

ukierunkowanej ewolucji), w przeciwieństwie do większości natywnych enzymów, nie stabilizowały stanu przejściowego, a destabilizowały stan podstawowy.²⁶

1.4.1.3. Fluktuacje termiczne

Zaprojektowanie siatki wiązań wodorowych w obrębie miejsca aktywnego muszą pozostać nieprzerwane bez względu na fluktuacje termiczne łańcuchów bocznych aminokwasów. W celu oceny ich trwałości często wykorzystuje się symulacje dynamiki molekularnej. Przykładowo, symulacje otrzymanej *de novo* retroaldolazy **RA22** wykorzystano do wyjaśnienia przyczyn jej niskiej aktywności.²⁷ Kluczowy łańcuch boczny reszty lizyny znalazł się zbyt daleko od substratu, a ten ułożył się w miejscu aktywnym pod innym kątem, oddziałując z grupami aromatycznymi. To przesunięcie wystarczyło, żeby do miejsca aktywnego mogła dostać się woda.

Podobny problem został wykryty dla eliminazy Kempa **HG3**²⁸: dostawanie się wody do miejsca aktywnego zostało rozwiązane przez przesunięcie go w głąb struktury. W trakcie projektowania tego enzymu autorzy skupili się na iteratywnym udoskonalaniu wybranego białka zamiast walidacji wielu projektów, opierając się na wiedzy zdobytej z symulacji dynamiki molekularnej i badań krystalograficznych.

Pierwszy otrzymany wariant, **HG1**, nie wykazywał mierzalnej aktywności enzymatycznej. Analiza strukturalna wykazała, że zmiany w orientacji łańcuchów bocznych tryptofanu i pobliskiej argininy względem modelu projektowego umożliwiły dostanie się cząsteczek wody do miejsca aktywnego. W związku z tym w kolejnym wariantcie, **HG2**, miejsce aktywne przesunięto do bardziej hydrofobowej, osłoniętej wnęki. Osiągnięta wydajność katalityczna wynosiła $123,2 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$. Na podstawie dalszych analiz MD oraz danych krystalograficznych zaproponowano kolejne mutacje, co doprowadziło do otrzymania eliminazy **HG3** o K_M równym $1,6 \pm 0,1 \text{ mM}$ i przyspieszeniu reakcji $5,9 \cdot 10^5$, istotnie wyższym od **HG2**.

1.4.1.4. Pole katalityczne

Kolejnym interesującym podejściem jest zastosowanie teorii pola katalitycznego, która traktuje stan przejściowy reakcji jako dipol w polu elektrycznym wywieranym przez enzym.²⁹ Na ten efekt składają się wszystkie niekowalencyjne oddziaływania, łącznie z ładunkami znajdującymi się z dala od miejsca aktywnego enzymu (ang. *periferal* lub *distal*).³⁰ Mechanizm działania pola katalitycznego można podzielić na dwa typy. Pierwszy z nich dotyczy reakcji, w których dochodzi do wzrostu lub spadku momentu dipolowego. Silniejsze pole elektryczne przyspiesza przejście w stan przejściowy o większym momencie dipolowym względem substratu, a słabsze – o mniejszym.³⁰ **Izomeraza ketosteroidowa** (KSI, EC 5.3.3.1) jest dobrze zbadanym przykładem tego efektu. Enzym ten wywiera wyjątkowo silne pole elektryczne (144 ± 6 MV/cm) na wiązanie karbonylowe 19-nortestosteronu.³¹ W trakcie reakcji moment dipolowy wzdłuż tego wiązania rośnie, więc silne pole elektryczne ma pozytywny wpływ na przebieg reakcji.

Drugi przypadek dotyczy reakcji, w trakcie których dochodzi do reorientacji dipolu.³⁰ W tym przypadku korzystane jest pole zgodne z orientacją stanu przejściowego. Jest to zgodne z ideą preorganizacji miejsca aktywnego. Energia, która jest potrzebna do przearanżowania enzymu w trakcie przebiegu reakcji, powinna być jak najmniejsza – dlatego enzym powinien być zorganizowany od razu w taki sposób, żeby odpowiadać rozkładowi ładunków stabilizujących stan przejściowy.¹⁵ Stopień trudności wzrasta jednak z liczbą etapów reakcji. Przykładem katalizy orientacyjnego pola elektrycznego jest **cyklofilina A** (EC 5.2.1.8), która ułatwia izomeryzację *cis-trans* wiązania peptydowego proliny. Stan przejściowy ten reakcji, w którym grupa karbonylowa jest zorientowana prostopadle do płaszczyzny peptydowej, stabilizowany jest przez odpowiednio zwrócone pole elektryczne.³⁰

Warto zaznaczyć, że teoria ta mogłaby wyjaśnić, dlaczego niektóre reakcje są mniej podatne na katalizę enzymatyczną i osiągają znacznie mniejsze przyspieszenia względem reakcji w roztworze. Dotyczy to przemian niezwiązanych ze znaczącą różnicą momentu dipolowego. Osiągane wtedy przyspieszenie może wynikać w znacznym stopniu z fizycznego zbliżenia do siebie substratów i orientowania ich przestrzennie, a nie ze stabilizacji stanu przejściowego.³⁰

Symulacje MD wykorzystano do optymalizacji pola elektrycznego eliminazy Kempa **KE15** poprzez wprowadzenie różnych mutacji; aktywność enzymu wzrosła z k_{cat}/K_M równego 27 do 403 $M^{-1}s^{-1}$.³² Inną metodą badania pól elektrycznych białek jest stosowana przez grupę S.G. Boxera spektroskopia wibracyjna Stark, z kolei W. Sokalski i współpracownicy rozwinęli metodę bottom-up.^{30,33}

1.4.1.5. Druga powłoka koordynacji i peryferyjne reszty aminokwasowe

Ze względu na zmiany w obrębie I powłoki i efekty takie jak pole katalityczne, zwraca się uwagę także na reszty aminokwasowe oddalone od miejsca aktywnego o więcej niż 10 Å.

Mutacje aminokwasów G121V i M42W w **reduktazie dihydrofolianowej** zmieniają sieć wiązań wodorowych koniecznych do zachowania aktywności, a dodatkowe badania NMR potwierdziły, że wprowadzenie waliny w miejscu 121 znacznie zmieniło równowagę konformacyjną białka.³⁴ Podobny efekt zaobserwowano dla **hydratazy nitrylowej**, której aktywność obniżyła się aż 70-krotnie po wprowadzeniu mutacji w obrębie drugiej powłoki koordynacji. Według bazy danych D3DistalMutation, analiza danych „dalekich” mutacji, dla których dostępne są odpowiadające im struktury 3D, pokazuje, że podczas gdy 80% mutacji ma wpływ na katalizę, tylko w 6,6% jest on pozytywny. Najczęściej powtarzającymi się korzystnymi zmianami są $S \rightarrow D$, $Y \rightarrow F$ i $T \rightarrow D$.³⁴

Wynika z tego, że reszty aminokwasowe znacznie oddalone od miejsca aktywnego mogą mieć zaskakujący wpływ na katalizę. Najczęstszą przyczyną są zmiany w dynamice i zwijaniu się białka, zamknięcie się tunelu lub wnęki potrzebnej do wiązania substratów, zmiany elektrostatyczne i naruszenie sieci wiązań wodorowych, koniecznych do transferu elektronów i orientujących reszty aminokwasowe w miejscu aktywnym w poprawnej geometrii.³⁵

1.4.1.6. Jednoczesna optymalizacja rusztowania i funkcji

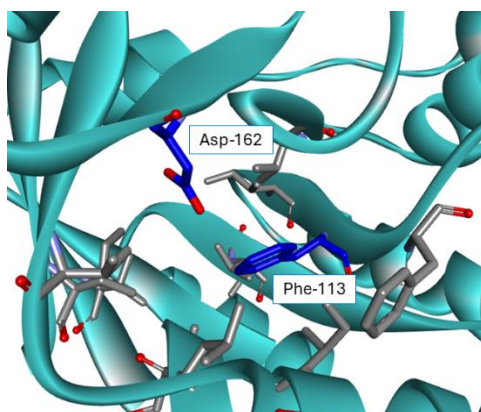
Kolejnym krokiem milowym w projektowaniu enzymów *de novo* była praca L. Mayo et al., która ukazała się w 2025 roku.³⁶ Metodologia, którą zastosowano do projektowania eliminaz Kempa, adresowała cztery kluczowe aspekty: różnorodność rusztowań białkowych, ich stabilność, proces związania się i aktywność katalityczną. Wybrany teozym, podobnie jak w poprzednich pracach, składał się z nukleofilowej reszty Asp lub Glu oraz aromatycznej reszty wprowadzającej oddziaływanie π - π .

W pierwszym etapie wygenerowano tysiące projektów beczulek TIM z fragmentów homologicznych białek. Do zaprojektowanych rusztowań wprowadzono teozym, a następnie optymalizowano pozostałe reszty w obrębie miejsca aktywnego. Około 100 najlepiej ocenionych białek poddano dalszej stabilizacji w obrębie całej struktury. Spośród 73 projektów, które zostały przetestowane eksperymentalnie, wybrano dwa najlepsze: **Des27** i **Des61**. Te warianty poddano kolejnej iteracji optymalizacji reszt w obrębie miejsca aktywnego, z wykluczeniem teozymu. Otrzymane mutanty wykazywały się znaczną poprawą parametrów kinetycznych, w szczególności **Des27.7** (rysunek 3). Symulacje dynamiki molekularnej sugerowały, że poprawa aktywności wynika z lepszego upakowania reszt hydrofobowych dookoła katalitycznej reszty Asp. Ułożenie reszt w obrębie miejsca aktywnego zostało potwierdzone strukturą krystaliczną (**PDB ID: 9HVB**).

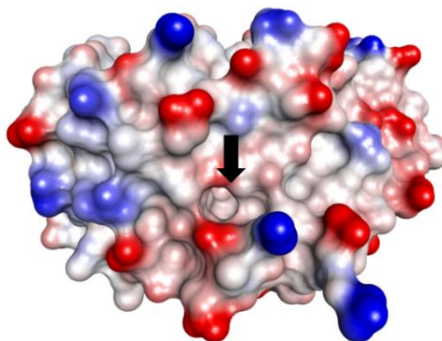
W ramach weryfikacji niezbędności reszt wchodzących w skład teozymu zastąpiono resztę fenyloalaniny leucyną, co doprowadziło do dalszego wzrostu wydajności enzymu aż do wartości $123000 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Mutacja ta najprawdopodobniej sprzyja lepszemu preorganizacji miejsca aktywnego.

Dodatkowo sprawdzono skuteczność zastosowanej metodologii z pominięciem etapu projektowania nowych rusztowań, wykorzystując struktury beczulek TIM modelowanych przez *AlphaFold*. Zauważono, że białka, które nie związały się kooperatywnie, nie wykazywały mierzalnej aktywności. Najlepsze otrzymane warianty, dla których otrzymano struktury krystaliczne — **Des49** i **R2.Des39** — wykazywały k_{cat}/K_M równe $100\text{-}150 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$.

A



B



Rysunek 3. (A) Miejsce aktywne w strukturze krystalicznej eliminazy Kempa **Des27.7** (PDB ID: 9HVB). Kolorem granatowym zaznaczono reszty wchodzące w skład teozymu. (B) Powierzchnia **Des27.7** pokolorowana zgodnie z interpolowanymi ładunkami. Strzałką zaznaczono tunel prowadzący do miejsca aktywnego.

Opublikowane wyniki wskazują, że skuteczne projektowanie enzymów *de novo* wymaga jednoczesnego uwzględnienia preorganizacji miejsca aktywnego jak i właściwości strukturalnych białka, a jakość wybranego rusztowania białkowego ma kluczowe znaczenie dla ostatecznego efektu katalitycznego. Ponadto równoczesne wprowadzanie mutacji w obrębie miejsca aktywnego i usztywniających całość struktury umożliwia zmniejszenie destabilizującego efektu wprowadzania mutacji odpowiadających za aktywność, a nawet – jak w tym przypadku – uzyskanie takiej sekwencji, w której oddziaływania w obrębie miejsca aktywnego działają stabilizująco. Wyniki te stanowią interesujący kontrast wobec często opisywanego kompromisu pomiędzy aktywnością katalityczną a stabilnością białek.^{37,38}

1.4.1.7. Budowanie rusztowania wokół teozymu

W 2025 roku pojawił się *preprint* opisujący nowe podejście do projektowania enzymów, wykorzystujące najnowsze metody sztucznej inteligencji. Motyw katalityczny (a właściwie teozym) został osadzony na fragmentach helikalnych korzystając z biblioteki sztucznych motywów (ang. *artificial motif library*). Fragmenty te połączono w jedną strukturę za pomocą metody dyfuzyjnej *RFdiffusion*, a w celu uzyskania wnęki o odpowiednich rozmiarach wprowadzono tymczasową helisę α , która została usunięta przed etapem generacji sekwencji w pakiecie *Rosetta*. Ponieważ helisa ta stanowiła odrębny łańcuch białkowy, nie wpłynęło to negatywnie na łańcuch główny białka. W rezultacie spośród 35 otrzymanych białek aż 7 wykazało aktywność katalityczną o $k_{cat} > 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ w reakcji rozszczepienia metodolu. Najlepsze wyniki uzyskano dla wariantów **RAD29** i **RAD35**, o k_{cat} równych $0,037 \text{ s}^{-1}$ i $0,031 \text{ s}^{-1}$ i stałych Michaelisa $0,35 \text{ mM}$ i $0,11 \text{ mM}$.³⁹

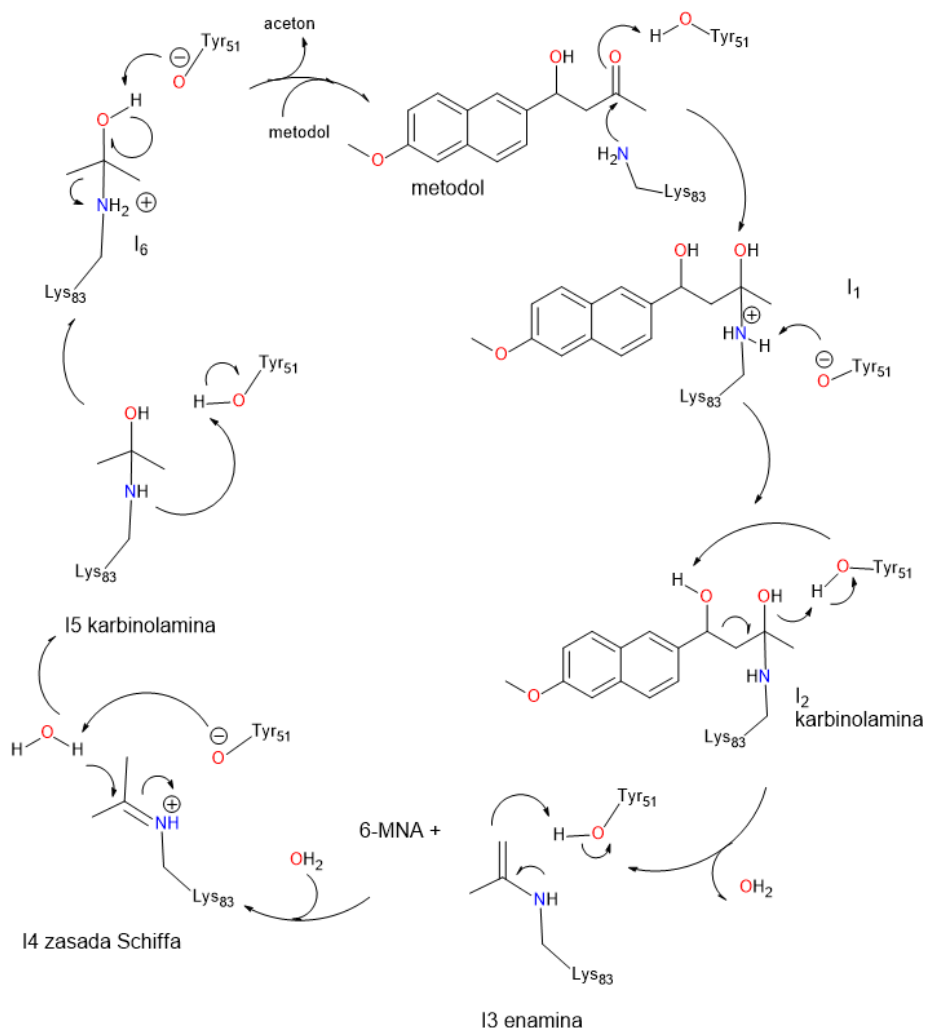
W najnowszych doniesieniach dotyczących projektowania hydrolaz serynowych *de novo* wykorzystano *RFDiffusion* oraz sieć głębokiego uczenia neuronowego *PLACER*, trenowaną na kompleksach białek z ligandami. Sekwencje wygenerowano przy użyciu *LigandMPNN*, *Rosetta FastRelax* i *AlphaFold2*. W rezultacie udało się otrzymać sztuczną hydrolazę serynową **mom1** katalizującą hydrolizę estrów 4-metylo-umbeliferonu. Następnie przeprojektowano ją do hydrolizy PET. Projekt o najlepszych parametrach katalitycznych, **mom120-103**, katalizował reakcję z k_{cat}/K_M do $2,2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.⁴⁰

1.4.2. Retroaldolazy

Reakcje aldolowe pozostają w centrum zainteresowania chemików ze względu na tworzące się nowe wiązanie węgiel-węgiel, potencjalnie stanowiące nowe centrum chiralne. Reakcji podlegają aldehydy lub ketony z wolnym protonem w pozycji α . Otrzymane w ten sposób β -hydroksyaldehydy – aldole – mogą ulec dehydratacji do związków nienasyconych. Podczas gdy same reakcje mogą być katalizowane przez kwasy lub zasady, odpowiednia czystość optyczna produktu jest osiągana przy wykorzystaniu mechanizmu enaminowego lub iminiowego katalizy.

Wspomniany w podrozdziale 1.4.1.1 protokół, polegający na osadzeniu teozymu w znanych rusztowaniach białkowych, został zastosowany do projektowania retroaldolaz katalizujących rozszczepienie nienaturalnego substratu: metodolu.³⁷

Przyjęto mechanizm katalizy enaminowej, analogiczny do mechanizmu aldolaz klasy I (rysunek 4). Proces rozpoczyna się nukleofilowym atakiem reszty lizyny na grupę karbonylową substratu, prowadzącym do powstania iminy po eliminacji cząsteczki wody. Uprotonowana zasada Schiffa stabilizuje rozwijający się ujemny ładunek i pełni rolę akceptora elektronów podczas etapu rozszczepienia wiązania węgiel-węgiel. Pośredni produkt enaminowy ulega tautomeryzacji do iminy, która następnie hydrolizuje, prowadząc do uwolnienia produktów reakcji i regeneracji centrum katalitycznego.⁴¹



Rysunek 4. Mechanizm retroaldolowego rozszczepienia metololu przez RA95.5-8F.⁴¹

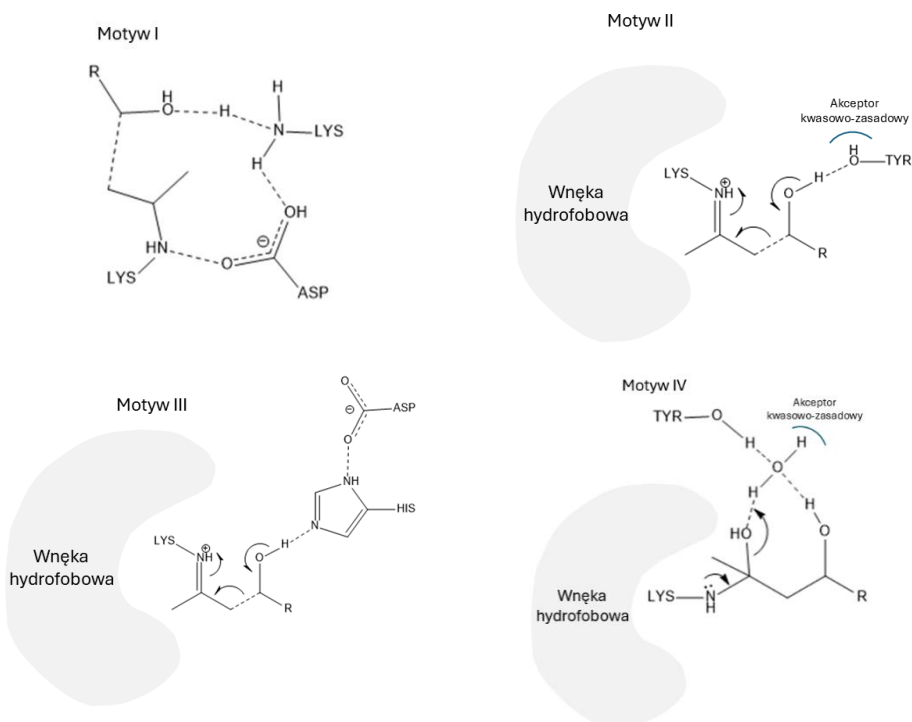
Powstanie enaminy jest możliwe dzięki zasadzie znajdującej się w miejscu aktywnym, którą może być odpowiednio zorientowana reszta aminokwasowa lub cząsteczka wody. Dodatkowo, do zajścia pierwszego etapu katalizy konieczne jest obniżone pK_a lizyny poniżej 7,5 – tak, aby była ona w nukleofilowej formie Lys-NH₂.⁴² Jest to możliwe, kiedy znajduje się ona w hydrofobowym środowisku o niskiej dielektryczności lub w pobliżu innych dodatnio naładowanych grup.

W celu zaimplementowania tego mechanizmu rozpatrywano kilka motywów strukturalnych, w których skupiono się na obniżeniu pK_a reszty Lys i deprotonacji grupy hydroksylowej substratu (tabela 1, rysunek 5). Teozymy zbudowano, korzystając

z kompozytowego TS, zawierającego wszystkie elementy, które powinny być stabilizowane przez enzym: substrat pozostał przyłączony do lizyny, wydłużono wiązanie C-C i uwzględniono częściowy ładunek ujemny rozwijający się w trakcie rozszczepienia.

Tabela 1. Porównanie motywów katalitycznych I-IV.

Cel	Motyw I	Motyw II	Motyw III	Motyw IV
Obniżenie pKa lizyny	Druga reszta Lys w sąsiedztwie	Wnęka hydrofobowa	Wnęka hydrofobowa	Wnęka hydrofobowa
Deprotonacja grupy hydroksylowej	Diada Lys-Asp	Tyr	Diada His-Asp	Cząsteczka wody, Ser/Thr/Tyr



Rysunek 5. Motywy katalityczne I-IV.

Spośród 38 projektów zawierających motyw IV, 22 wykazały mierzalną aktywność katalityczną o przyspieszeniach reakcji rzędu 10^3 - 10^4 . Najwyższą aktywność osiągnął wariant **RA61**, zbudowany na rusztowaniu typu „jelly-roll”. Motyw III również okazał się skuteczny – 10 z 13 białek było aktywnych ($k_{cat}/k_{uncat} = 10^2$ - 10^3), w tym oparty

na beczulce TIM wariant **RA22**.⁴³ Z kolei projekty zawierające motyw I lub II nie były aktywne, co przypisano prawdopodobnemu zerwaniu sieci wiązań wodorowych lub zmianom orientacji lub protonacji grup funkcyjnych.³⁷

Pomimo pewnego sukcesu motywów III i IV, wiele projektów było nieaktywnych lub wykazywało stosunkowo niską aktywność, co skłoniło badaczy do ponownego podejścia do problemu w 2012 roku, wykorzystując bardziej dopracowane algorytmy projektowania.⁴²

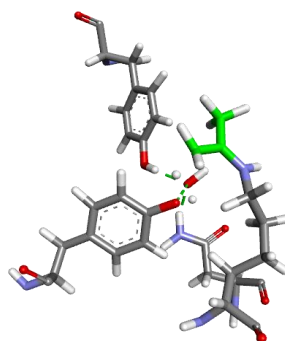
Tym razem skupiono się na pojedynczym motywie katalitycznym, który składał się z reszty lizyny umiejscowionej w hydrofobowej wnęce oraz z cząsteczki wody. Zmiany względem poprzedniego podejścia objęły także filtrowanie wyników — uwzględniono jedynie te projekty, w których upakowanie miejsca aktywnego nie zmieniało się znacznie po minimalizacji energii bez i w obecności TS.⁴²

W rezultacie otrzymano 33 aktywne białka, w tym wariant **RA95**, który następnie poddano ukierunkowanej ewolucji, zwiększając jej aktywność 4400-krotnie.⁴⁴ Co ciekawe, wzrost aktywności wiązał się z zupełnym przebudowaniem centrum aktywnego. Wariant **RA95.5-5** utworzył nową hydrofobową wnękę, w której Lys-83 pełniła funkcję katalityczną, a Tyr-51 i Asn-110 uczestniczyły w transferze protonów. Kolejne optymalizacje pomogły wyłonić jeszcze aktywniejszy wariant, **RA95.5-8F**, a dokładna analiza struktury krystalicznej tego wariantu potwierdziła powstanie tetrady katalitycznej Lys-Tyr-Asn-Tyr (rysunek 6).⁴⁵

A



B



Rysunek 6. (A) Reprezentacja wstążkowa struktury krystalicznej retroaldolazy **RA95.5-8F** ze związanym stanem przejściowym. Reszty uczestniczące w katalizie zostały przedstawione patyczkowo. (B) Tetrada katalityczna Lys-Tyr-Asn-Tyr ze związanym stanem przejściowym.

Tę samą reakcję katalizuje białko o budowie beczułki β (ang. *β -barrel*), które zostało zaprojektowane zupełnie od podstaw. Projektowanie rozpoczęto od podziału struktury na dwie części zgodnie z ich funkcją. Fragment katalityczny zawierał wnękę prowadzącą do reszty lizyny, a pozostała część beczułki służyła usztywnieniu struktury. Dopasowanie sekwencji przebiegało etapowo z wykorzystaniem pakietu *Rosetta*. W pierwszej kolejności wytypowano 8 wariantów, które wykazywały zwijanie się w strukturę β -kartki. W następnym etapie sprawdzono dostępność i reaktywność katalitycznej lizyny, znakując ją, co umożliwiło wyłonienie najlepszych analogów na podstawie spektrometrii mas. Następne etapy optymalizacji polegały na poprawieniu dostępu do miejsca aktywnego, a następnie wprowadzeniu do niego sieci wiązań wodorowych, z wykluczeniem niekorzystnego dla katalizy bliskiego kontaktu reszty Lys z Glu lub Asp. Kontakt ten mógłby doprowadzić do utworzenia się nieaktywnego mostka solnego.

W rezultacie otrzymano **Ra β b-16.1**, białko preferujące (S)-metodol, o $k_{cat}/k_{uncat} = 3,8 \cdot 10^6$ i $K_M 230 \pm 40 \mu\text{M}$. Po poddaniu go PCR podatnemu na błędy, uzyskano jeszcze aktywniejszy wariant, **Ra β b-16.2** ($k_{cat}/k_{uncat} = 4,1 \cdot 10^6$; $K_M = 50 \mu\text{M}$).⁴⁶

Tabela 2. Porównanie sztucznych aldolaz zaprojektowanych *de novo*.

nazwa	miejsce aktywne	substrat	k_{cat}/k_{uncat}	K_M [μM]
RA22 ³⁷	Lys, His, Asp	metodol	$8,1 \cdot 10^3$	480 ± 130
RA61 ³⁷	Lys, H ₂ O, Thr, Ser, Tyr	metodol	$2,3 \cdot 10^4$	210 ± 50
RA95 ⁴²	Lys, Tyr	metodol	$1,5 \cdot 10^4$	530
RA95.5-5 ⁴⁴	Lys, Tyr, Asn	(R)-metodol	$2,8 \cdot 10^7$	410
RA95.5-8F ₄₅	Lys, Tyr, Asn, Tyr	(R)-metodol	$5,5 \cdot 10^7$	230
Raβb-16.1 ⁴⁶	Lys, Tyr, Ser	(S)-metodol	$3,8 \cdot 10^6$	230 ± 40
Raβb-16.2 ⁴⁶	Lys, Tyr, Ser	(S)-metodol	$4,1 \cdot 10^6$	50
RAD29 ³⁹	Lys, Tyr, Asn, Tyr	metodol	$5 \cdot 10^6$	350

RAD35 ³⁹	Lys, Tyr, Asn, Tyr	metodol	5·10 ⁶	110
----------------------------	--------------------	---------	-------------------	-----

Retroaldolazę **RA95.5.8F** poddano testom specyficzności substratowej, dowodząc, że jest ona w stanie także katalizować tworzenie nowych wiązań węgiel-węgiel. Z sukcesem przeprowadzono reakcje takie jak kondensacje Knoevenagela, Henry’ego, addycje Michaela i reakcje aldolowe akceptorów aldehydowych z acetonem. W ich przypadku konieczne było użycie znacznego nadmiaru acetonu (3-5 mM aldehydu i 2-3 M acetonu).⁴⁵

1.5. Minibiałka

Minibiałka to polipeptydy o masie poniżej 10 kDa, wykazujące charakterystyczną dla białek zdolność do zwijania się w roztworach wodnych w stabilne struktury trzeciorzędowe.⁴⁷ Stanowią więc grupę łączącą zalety peptydów i białek.⁴⁸ Względnie krótkie sekwencje umożliwiają syntezę drogą chemiczną, znacznie upraszczając wprowadzanie niekanonicznych reszt aminokwasowych, a nawet modyfikacje łańcucha głównego. Dobrze nadają się do projektowania *de novo*, dzięki czemu możliwe jest otrzymanie cząsteczek o topologii i cechach niespotykanych w naturze.

Zainteresowanie zwijaniem się minibiałek wynika w dużej mierze z kombinacji ich małego rozmiaru z wyjątkową stabilnością konformacyjną.⁴⁷

Spontaniczność zwijania się w określoną konformację zależne jest od zmiany energii Gibbsa podczas procesu, zadanej równaniem⁴⁹:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

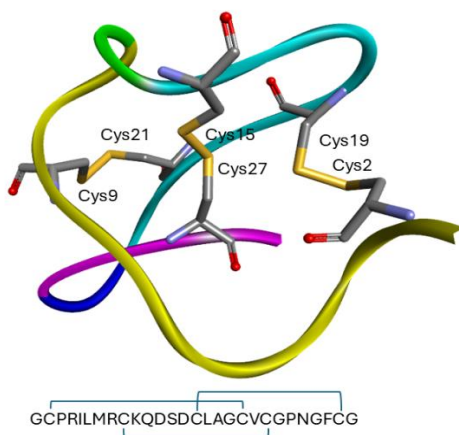
Zwinięcie się zajdzie więc wtedy, kiedy różnica jest negatywna. Pierwszy człon równania, entalpia, zależy od stabilizujących oddziaływań, takich jak wiązania wodorowe, oddziaływania elektrostatyczne, interakcje van der Waalsa i mostki disiarczkowe.⁵⁰ Drugi człon zawiera w sobie efekt hydrofobowy. Wyparcie cząsteczek wody z hydrofobowego wnętrza białka uwalnia je do masy rozpuszczalnika, w którym mogą swobodnie się poruszać, tworząc i zrywając wiązania wodorowe. Dzięki temu kompensowany jest lokalny spadek entropii wskutek większego uporządkowania w obrębie białka.

Stabilność natywnych białek jest często jedynie marginalna i osiągnięta dzięki wielu słabym oddziaływaniom między setkami reszt aminokwasowych. Krótsze sekwencje minibiałek muszą przekładać się więc na wyjątkową kompaktowość i gęstość stabilizujących interakcji. Struktury minibiałek są często sztywne, z dużą ilością mostków disiarczkowych, mostków solnych, koordynacją jonów metali i dobrze upakowanym rdzeniem hydrofobowym.

1.5.1. Natywne minibiałka

W naturze minibiałka pełnią funkcje hormonów, czynników wzrostu, cyklotydów, peptydów drobnoustojowych i toksyn. Są więc doskonale dopasowane do obrony, kontroli i sygnalizacji komórkowej. Często nazywa się nimi domeny większych białek, które zachowują konformację w izolacji.^{51,52}

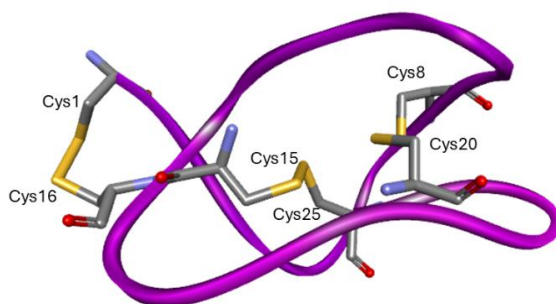
Mostki disiarczkowe są jednymi z najczęściej spotykanych sposobów usztywnienia struktury minibiałek. Nic dziwnego – są to najsilniejsze wiązania między resztami aminokwasowymi, a jeden mostek disiarczkowy wnosi do energii denaturacji aż 2,3-5,2 kcal/mol.^{53,54}



Rysunek 7. Inhibitor trypsyny II *Ecballium elaterium*, (PDB ID: 2ETI)

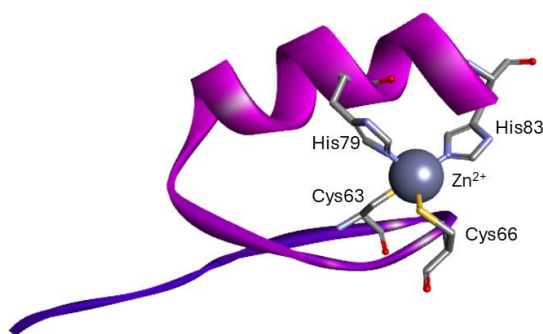
Powtarzającym się motywem strukturalnym jest tzw. węzeł cysteinowy (ang. *cysteine knot*), charakterystyczny dla **knotyn** i **cyklotydów**.⁵⁵ Składa się on z trzech mostków disiarczkowych, z których jeden przeplata się przez makrocykl tworzony przez dwa pozostałe (rysunek 7). Takie ułożenie wyjątkowo usztywnia przyjętą konformację.⁵⁶

Knotyny są odporne na denaturację termiczną, chemiczną oraz proteolityczną – zachowują trójwymiarową strukturę i funkcję nawet po gotowaniu.⁵⁷ W połączeniu z niską immunogenicznością i biodostępnością, mają duży potencjał terapeutyczny. Pierwszą knotyną zatwierdzoną przez FDA była **omega-konotoksyna MVIIA**, która pod nazwą *ziconotide* jest stosowana w leczeniu silnego przewlekłego bólu (rysunek 8).⁵⁷



Rysunek 8. Struktura omega-konotoksyny MVIIA otrzymana na podstawie spektroskopii NMR. (PDB ID: 1DW4)

Wiele minibiłek zawiera miejsca wiązania jonów metali, czego typowym przykładem jest **domena palca cynkowego** (ang. *zinc finger domain*).^{51,58} Jest to motyw strukturalny $\beta\beta\alpha$, zawierający dwie cysteiny i dwie histydyny koordynujące jon Zn^{2+} (rysunek 9). Znajduje się w wielu białkach, w których odpowiada za wiązanie makrocząsteczek takich jak DNA.



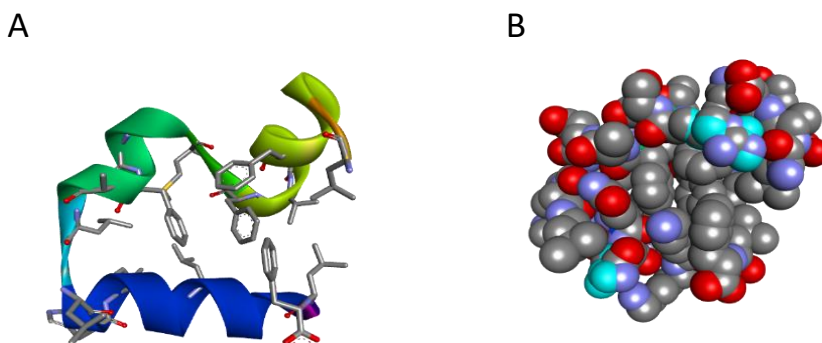
Rysunek 9. Struktura krystaliczna palca cynkowego. (PDB ID: 1MEY)

Ciekawy przypadek stanowią minibiłka stabilizowane przez rdzeń hydrofobowy, których zwijanie się jest w dużej mierze napędzane przez skłonność do agregacji

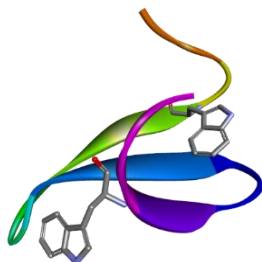
niepolarnych reszt. Odizolowane od rozpuszczalnika reszty niepolarne są ciasno upakowane, wykluczając obecność cząsteczek wody z wnętrza struktury. Z tego powodu większość minibiałek tego typu przyjmuje globularny kształt.^{59,60,61}

Zaletą tej grupy jest jej uniwersalność; odpowiednie konformacje są stabilne w szerokim zakresie pH, niezależnie od warunków redoks ani obecności kofaktorów. Dodatkowo zwijanie się przebiega bez dodatkowych etapów, co oznacza, że po zszyntetyzowaniu łańcucha polipeptydowego nie ma konieczności przeprowadzenia dodatkowych reakcji chemicznych. Co najważniejsze, rdzeń nie interferuje z funkcją minibiałka, pozwalając zachować dynamikę bez wprowadzenia potencjalnie reaktywnych elementów.

W ten sposób stabilizowana jest C-końcowa **poddomena wiliny**.^{59,62} Jest to 35-aminokwasowy polipeptyd składający się z trzech helis, których ułożenie stabilizuje hydrofobowy rdzeń składający się z reszt Phe, Leu, Ala, a także oddziałujących z nimi lizyn (rysunek 10).⁶² Kolejnym przykładem jest **domena WW**, zwijająca się w trójnicową β -kartkę (rysunek 11). Jest to motyw strukturalny powtarzający się w wielu białkach, zawierający dwie wysoce konserwowane reszty Trp.⁶³



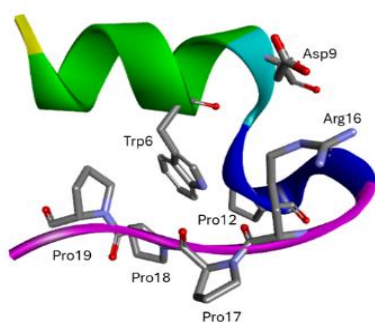
Rysunek 10. Struktura krystaliczna poddomeny C-końcowej białka **wiliny** (PDB ID: 1WY3) w reprezentacji (A) wstążkowej, a reszty niepolarnych i aromatycznych aminokwasów w formie patyczkowej. (B) CPK (atomy przedstawione jako kulki o promieniu proporcjonalnym do ich promienia van der Waalsa). Kolorem niebieskim (cyjan) zaznaczono alternatywne rotamery łańcuchów bocznych.



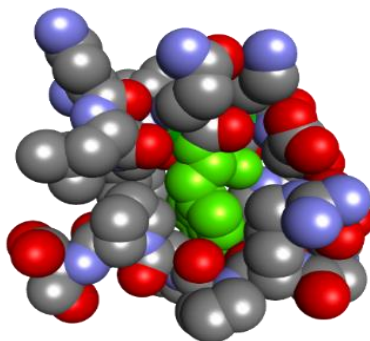
Rysunek 11. Struktura krystaliczna ludzkiej domeny WW FE65. (PDB ID: 2IDH)

Innym interesującym przypadkiem jest 20-aminokwasowe minibiałko **TC5b**, będące zoptymalizowanym wariantem motywu klatki tryptofanowej (ang. *Trp-cage*), zaprojektowanego poprzez skrócenie i zmodyfikowanie 39-aminokwasowej sekwencji ekstenatydu (ang. *exendin-4*) (rysunek 12).⁶⁴ Otrzymany motyw strukturalny jest jednym z najkrótszych znanych peptydów o kooperatywnym, dwustanowym procesie zwijania się ($T_M = 42\text{ °C}$ w $\text{pH} = 7$). Pomimo wyjątkowo krótkiej sekwencji, zawiera on ciasno upakowany rdzeń hydrofobowy w którego centrum znajduje się reszta Trp-6. Mutacje tryptofanu na Phe lub His prowadziły do rozwinięcia się minibiałka. Struktura została dodatkowo usztywniona obecnością czterech prolin oraz mostkiem solnym pomiędzy Asp-9 a Arg-16.⁶⁵

A



B

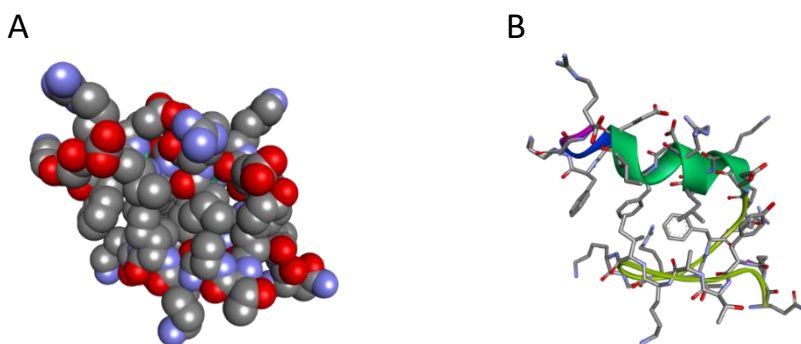


Rysunek 12. Struktura minibiałka **TC5b** wyznaczona przy zastosowaniu spektroskopii NMR. (PDB ID: 1L2Y) (A) Reprezentacją patyczkową pokazano reszty aminokwasowe najbardziej przyczyniające się do stabilizacji struktury. (B) Minibiałko w reprezentacji CPK pokolorowane według typu atomu, z wyjątkiem tryptofanu, który zaznaczono kolorem zielonym.

1.5.2. Minibiałka zaprojektowane *de novo*

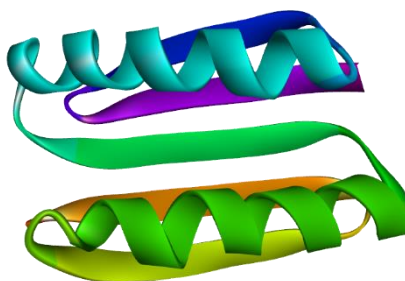
Projektowanie *de novo* polega na tworzeniu zupełnie nowych sekwencji aminokwasów, zwijających się w wybraną strukturę przestrzenną. W porównaniu z metodami opartymi na strukturze (ang. *structure-based design*) wyróżnia się koniecznością zbudowania zupełnie nowego szkieletu białkowego. Dzięki temu możliwe jest tworzenie minibiałek o topologiach niewystępujących w naturze. Otrzymane cząsteczki są przedmiotem wielu badań dotyczących zwijania się białek, a dzięki ich minimalistycznej formie, możliwe jest testowanie wielu analogów w stosunkowo krótkim czasie.^{66,67}

Minibiałko **FSD-1** (Full Sequence Design 1) było pierwszym zaprojektowanym w sposób w pełni zautomatyzowany (rysunek 13). Szkielet docelowej struktury oparto na szablonie domeny palca cynkowego **Zif268**. Dla każdej pozycji w sekwencji zdefiniowano zestaw dopuszczalnych aminokwasów w zależności od ich lokalizacji strukturalnej: w rdzeniu hydrofobowym (reszty A,V,L,I,F,Y,W), w miejscu przejściowym (wszystkie), na powierzchni (A,S,T,H,D,N,E,Q,K,R) lub w miejscach wymagających dużej elastyczności (G). Na tej podstawie wygenerowano bibliotekę kombinatoryczną wszystkich możliwych sekwencji z uwzględnieniem rotamerów. Bibliotekę przeszukano z zastosowaniem algorytmu *Dead-End Elimination*, a strukturę otrzymanego minibiałka potwierdzono eksperymentalnie metodą spektroskopii NMR.^{68,69}



Rysunek 13. Struktura minibiałka **FSD-1** wyznaczona przy zastosowaniu spektroskopii NMR. (PDB ID: 1FSD) (A) Minibiałko w reprezentacji CPK pokolorowane według typu atomu. (B) Reprezentacja wstążkowa; w postaci patyczkowej pokazano łańcuchy boczne aminokwasów.

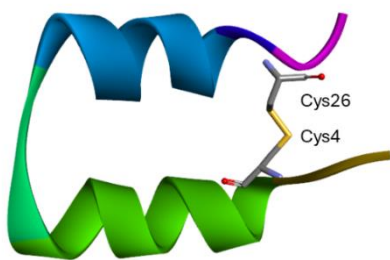
przez rdzeń hydrofobowy (rysunek 15). Co ciekawe, podczas zwijania tworzy on stabilne stany pośrednie. Przekłada się to na wolniejszą i wieloetapową kinetykę zwijania. Niektóre motywy w obrębie struktury są znacznie stabilniejsze niż jego globalna architektura, prowadząc do powstania lokalnych minimów energii.⁷³



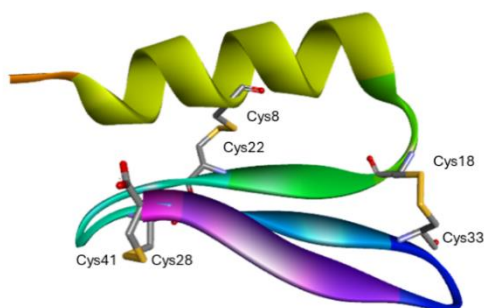
Rysunek 15. Struktura krystaliczna **Top7** w reprezentacji wstążkowej. (PDB ID: 1QYS)

Analogiczna metodologia została wykorzystana do zaprojektowania minibiałek bogatych w cysteiny **gHH_44** (PDB ID: 5TX8) i **gHEEE_02** (PDB ID: 5W9F) (rysunek 16). Optymalizację sekwencji oparto jednak na wynikach symulacji MD.⁷⁴ Minibiałko **gHH_44** składa się z motywu helisa-zwrot-helisa, w którym helisy połączone mostkiem disiarczkowym. Natomiast **gHEEE_02** to minibiałko o topologii helisa- β -kartka, w którym wiązania kowalencyjne wprowadzono między nicią β oraz nicią β a helisą α .

A



B



Rysunek 16. Struktury wyznaczone z zastosowaniem spektroskopii NMR. (A) **gHH_44** (PDB ID: 5TX8) (B) **gHEEE_02** (PDB ID: 5W9F)

Od momentu publikacji na temat zaprojektowanego *de novo* minibiałka **TOP7**, pakiet Rosetta stał się złotym standardem w dziedzinie inżynierii białek. Oprogramowanie to zawiera wiele algorytmów, spośród których większość opiera się na minimalizacji energii metodą Monte Carlo.⁷⁵

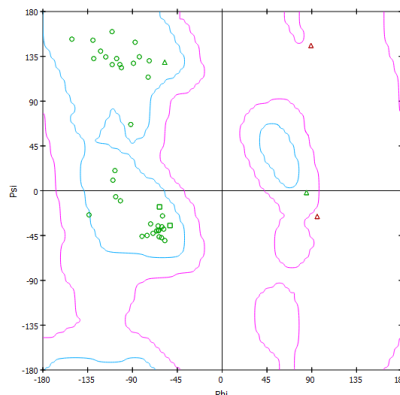
Projektowanie *de novo* zaczyna się od wygenerowania nowego rusztowania, którego geometria musi być fizycznie możliwa. Standardowo robi się to na dwa sposoby: poprzez składanie krótkich fragmentów białkowych lub zadanie parametrów kątów torsyjnych.⁷¹

W pierwszym przypadku wykorzystuje się bibliotekę krótkich fragmentów (3-9 aminokwasów), których składanie przebiega zgodnie z algorytmem Monte Carlo.⁷⁶ Testowane są losowe perturbacje ułożenia fragmentów. Akceptacja zmian przebiega zgodnie z kryterium Metropolis⁷⁷:

$$P = \begin{cases} 1 & \text{dla } \Delta E \leq 0 \\ e^{-\frac{\Delta E}{kT}} & \text{dla } \Delta E > 0 \end{cases}$$

Pozostało więc małe prawdopodobieństwo przyjęcia zmiany nawet w przypadku wzrostu energii. Wprowadzenie losowości umożliwia przeskoczenie barier energetycznych i wyjście z lokalnych minimów.

W najprostszym przypadku do oceny wlicza się kilka głównych czynników składających się na jakość łańcucha głównego. Przede wszystkim punktowane są wiązania wodorowe w obrębie struktur drugorzędowych, zgodność z wykresem Ramachandrana (rysunek 17), brak zawad sterycznych, promień gyracji i tworzenie się rdzenia hydrofobowego.^{77,78}



Rysunek 17. Wykres Ramachandrana dla domeny **MvaT**. Każdy aminokwas reprezentowany jest zielonym kółkiem lub czerwonym trójkątem. Regiony ograniczone niebieską linią to pary ϕ , ψ przyjmowane przez β -kartki i α -helisy, a różową linią – regiony dozwolone (takie, w których nie występują zawady steryczne). Wyjątkiem jest glicyna, która może przyjmować dowolne kąty torsyjne.

Możliwe jest także naprowadzenie procesu składania fragmentów na konkretną topologię poprzez wykorzystanie procedury BluePrint.⁷⁹ W tym przypadku definiuje się struktury drugorzędowe, ich długości i sposób połączenia, a nawet klasyfikację kątów torsyjnych ABEGO, co jest szczególnie użyteczne w przypadku pętli.⁸⁰ Zadane mogą być także warunki ograniczające, takie jak wymagane odległości pomiędzy konkretnymi atomami. Alternatywnie możliwe jest wykorzystanie idealnych kątów torsyjnych struktur drugorzędowych i wygenerowanie jedynie łączących je pętli.

Stochastyczny algorytm Monte Carlo wykorzystywany jest nie tylko do projektowania struktury łańcucha głównego białka, ale także do generowania stabilizującej go sekwencji.⁷⁷ Algorytm opiera się na wprowadzeniu małych perturbacji, takich jak małe zmiany torsji, insercje i zamiany rotamerów.

1.5.2.2. Inne algorytmy generowania sekwencji

Monte Carlo nie jest jedyną metodą generowania sekwencji aminokwasowych. Jedną z alternatyw jest algorytm genetyczny, którego działanie wzorowano na mechanizmach ewolucyjnych.^{81,82} Każda iteracja procedury zaczyna się od wielu sekwencji, spośród których najlepsi kandydaci wybierani są na podstawie oszacowanej energii. Pomiedzy nimi dochodzi do krzyżowania, czyli wymiany fragmentów. Dodawane są także losowe mutacje rotamerów. Nowy zestaw sekwencji poddany jest kolejnej selekcji.

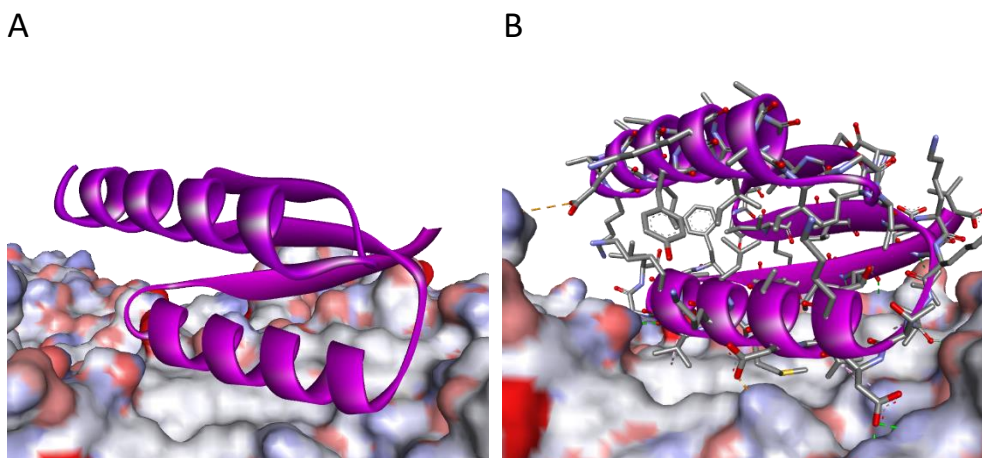
Dead-End Elimination to z kolei algorytm deterministyczny, znajdujący globalne minimum dla z góry zdefiniowanej przestrzeni rotamerów.^{83,84} Dla każdej pozycji eliminowane są te rotamery, które nie mogą należeć do globalnego minimum, prowadząc do jednej sekwencji. Nie oznacza to jednak, że otrzymana sekwencja jest lepsza niż ta otrzymana w procesie stochastycznym. Determinizm procedury wynika jedynie z tego, że operuje na skończonym zestawie rotamerów, podczas gdy poprzednio przytoczone metody wprowadzają dodatkowe, losowe zmiany.

1.5.2.3. Metody uczenia głębokiego

Przez ostatnich kilka lat szybki rozwój metod AI zaowocował wprowadzeniem metod uczenia maszynowego do niemal każdego etapu projektowania minibiałek *de novo*. Coraz częściej struktury geometryczne otrzymuje się, korzystając z modelu dyfuzyjnego RFDiffusion.¹⁷

W 2023 roku Watson *et al.* opisali nową metodologię projektowania cząsteczek wiążących białka *de novo*.⁸⁵ Podejście to opiera się na wykorzystaniu modelu dyfuzyjnego RFDiffusion do generowania szkieletu białka bezpośrednio w kontekście docelowego białka, następnie narzędzia ProteinMPNN do generacji sekwencji i Alphafold do filtrowania wyników.^{86,87} Zastosowanie tej strategii pozwoliło znacznie zredukować liczbę projektów wymagających eksperymentalnej walidacji. Jednym z uzyskanych w ten sposób minibiałek było **HA_20**, 65-aminokwasowe minibiałko wiążące hemaglutyninę wirusa grupy (HA) o stałej dysocjacji $K_D = 28$ nM (rysunek 18).⁸⁵ Jego struktura i miejsce wiązania się zostały potwierdzone mikroskopią elektronową.

Podobna metodologia została wykorzystana do projektowania minibiłkowych antagonistów induktorów burzy cytokinowej.⁸⁸



Rysunek 18. Struktura cryo-EM bindera HA_20 na powierzchni HA. (PDB ID: 8SK7)

1.5.2.3.1 RFDiffusion

Modele dyfuzyjne należą do technik uczenia maszynowego, które zyskały szerokie zastosowanie w projektowaniu białek. W procesie treningu wykorzystuje się rozwiązane struktury białek dostępne w bazach danych, do których stopniowo wprowadza się szum (ang. *noising*), aż położenie i orientacja fragmentów — tzw. *residue frames* — klatki reszt aminokwasowych — jest niemal zupełnie przypadkowe. Następnie model uczy się odtworzyć oryginalną strukturę (ang. *denoising*), dzięki czemu jest w stanie przewidzieć realistyczne łańcuchy główne o zadanej długości.^{85,17}

Model RFDiffusion jest wyjątkowo użytecznym narzędziem do generowania pętli, cząsteczek wiążących czy osadzania motywu w rusztowaniu. Dostarczone przez użytkownika rusztowanie pełni funkcję kotwicy dla generowanego fragmentu i nie jest objęte procesem dyfuzji. W następnym etapie konieczne jest zastosowanie metody przewidywania sekwencji aminokwasów (najczęściej ProteinMPNN), ponieważ RFDiffusion nie uwzględnia łańcuchów bocznych. Ze względu na możliwość osadzenia motywu w rusztowaniu, metoda ta została wykorzystana do zaprojektowania *de novo* enzymów, np. hydrolaz serynowych oraz retroaldolaz **RAD29** i **RAD35**.⁴⁰

1.5.2.3.2. Alphafold

Alphafold, system uczenia głębokiego opracowany przez Google DeepMind, zrewolucjonizował chemię, pozwalając na szybkie i dokładne przewidywanie struktur trójwymiarowych białek na podstawie ich sekwencji.⁸⁶ Jego udział w (częściowym) rozwiązaniu problemu zwijania się białek doceniono, przyznając nagrodę Nobla w dziedzinie chemii Demisowi Hassabisowi i Johnowi Jumperowi w 2024 roku. Chociaż Alphafold nie tworzy nowych sekwencji, jest częścią wielu nowych procedur projektowania *de novo*, gdzie używa się go do filtrowania i weryfikacji wyników. Poza Alphafold, dostępne są również podobne modele opracowane przez inne grupy, takie jak RosettaFOLD i ChaiDiscovery.^{89,90}

Głównym ograniczeniem Alphafold są nierównomiernie rozłożone dane treningowe spowodowane przez znacznie częstsze pojawianie się niektórych typów białek w bazach danych. Rzadziej występujące fałdy i nienaturalne aminokwasy nie są brane pod uwagę ze względu na zbyt małą ilość dostępnych struktur. Dodatkowo algorytmy AI często działają jak tzw. czarna skrzynka – nawet jeśli wyniki są precyzyjne, nie pozwalają one na zrozumienie mechanizmów leżących u podstaw procesu.

1.5.2.3.3. ProteinMPNN

ProteinMPNN to model uczenia głębokiego, który zazwyczaj łączy się z Alphafold i RFDiffusion. Traktuje on białka jako grafy 3D, w których każda reszta aminokwasowa jest węzłem, a krawędzie łączą je z sąsiadującymi resztami. Każdy węzeł ma swój wektor, który zawiera informacje o tej reszcie i informacje o jej sąsiadach.⁸⁷ Obliczane jest prawdopodobieństwo występowania każdego aminokwasu w każdej pozycji (sprawdzone jest, czy otoczenie danego aminokwasu jest optymalne). Następnie wyniki są filtrowane, wykorzystując wybraną funkcję oceniającą (np. Rosetta *score*) i testowane w Alphafold. Największą zaletą tej metody jest uczenie się na danych trójwymiarowych oraz jej szybkość.

1.6. Minibiałka katalityczne

Wyjątkowe właściwości minibiałek czynią je obiecującą grupą związków, których potencjał katalityczny nie został jeszcze w pełni wykorzystany. Podczas gdy stosowanie małych cząsteczek często wymaga wieloetapowej syntezy oraz prowadzenia reakcji w agresywnych środowiskach (toksyczne rozpuszczalniki, skrajne wartości pH czy wysoka temperatura), wykorzystanie enzymów ograniczają ich złożona struktura oraz wrażliwość na czynniki zewnętrzne. Minibiałka skutecznie wypełniają tę lukę: charakteryzują się wysoką stabilnością i mniejszą złożonością, zachowując przy tym zdolność do pracy w buforach wodnych, precyzyjnego wiązania ligandów oraz tworzenia specyficznego środowiska reakcyjnego.⁹¹

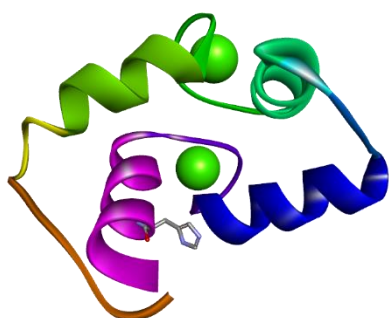
Jako minibiałka katalityczne można zdefiniować zmodyfikowane domeny enzymów, które funkcjonują jako autonomiczne katalizatory. Przykładem jest mini-matrylizyna, 60-aminokwasowa, skrócona forma metaloproteiny macierzy pozakomórkowej (MMP-7). Usunięcie niemal 60% domeny obniżyło wydajność katalizy około 400-krotnie; utrzymała się ona jednak na poziomie $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Zachowana została również zdolność do wiązania substratu i inhibitorów, co wskazuje, że jest to kluczowy fragment oryginalnego enzymu, który może funkcjonować samodzielnie.⁹²

Ze względu na uproszczoną topologię, minibiałka katalityczne projektowano opierając się na intuicji chemicznej. Takie podejście wykorzystano do skonstruowania minimalnego mimetyka anhidrazy węglanowej. Autorzy publikacji z 2014 roku, inspirowani motywem palców cynkowych, zaprojektowali białko o topologii $\alpha\beta\beta$ stabilizowanej przez koordynację jonu Zn^{2+} .¹⁶ Na początku zdefiniowano szczegółowe założenia projektowe, zakładając utworzenie miejsca aktywnego w postaci motywu $\text{Zn}(\text{His})_3\text{O}$. Określono preferowane długości oraz sposób połączenia elementów struktury drugorzędowej, optymalne rozmieszczenie reszt histydyny, a także potencjalne miejsce wiązania substratu. Dodatkowo wprowadzono zwrot D-Pro-Gly, sprzyjający formowaniu β -spinki. Na podstawie tych wytycznych przygotowano zestaw ograniczeń geometrycznych. Optymalny szkielet strukturalny wygenerowano przy użyciu algorytmu symulowanego wyżarzania (ang. *simulated annealing*) w oprogramowaniu CYANA. Jest

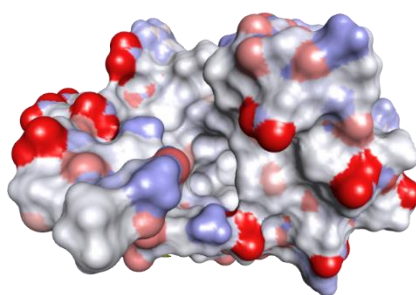
to metoda Monte Carlo, w której stopniowe obniżanie temperatury pozwala na przeskoczenie lokalnych minimów energetycznych. Pozostałą część sekwencji dobrano na podstawie chemicznej intuicji. Otrzymane minibiałka wykazywały aktywność katalityczną wobec octanu p-nitrofenylu, osiągając k_{cat}/K_M w zakresie 1,1 – 2,8 M⁻¹s⁻¹.

Zupełnie inną metodologię zastosowano przy projektowaniu esterazy opartej na 74-aminokwasowej C-końcowej domenie kalmoduliny.⁹³ Najpierw wybrano substrat, który następnie zadokowano na powierzchni kalmoduliny przy użyciu programu AutoDock Vina.⁹⁴ Testowana cząsteczka, p-nitrofenylo-(2-fenyl)propanian (pNPP), dopasowała się do jednej z hydrofobowych wnęk. Zidentyfikowano reszty aminokwasowe w pobliżu miejsca wiązania i przeanalizowano wpływ zamiany każdego z nich na katalityczną histydynę na ocenę obliczoną w *Rosetta*. Najlepiej ocenioną mutację, M144H, przetestowano eksperymentalnie. Otrzymane minibiałko **AlleyCatE** katalizowało hydrolizę R-pNPP z k_{cat}/K_M równym 4800 ± 300 M⁻¹min⁻¹ (rysunek 19). Po zastosowaniu DE zidentyfikowano mutant A128T, którego k_{cat}/K_M wzrosło o ok. 40%. Aktywność katalityczna została więc wprowadzona do nieaktywnego rusztowania za pomocą zaledwie jednej mutacji. Rozpoczęcie projektowania od znalezienia optymalnego miejsca wiązania substratu zapewniło dobrą specyficzność substratową i zmniejszyło potrzebę modyfikacji reszt oddziałujących z substratem.

A



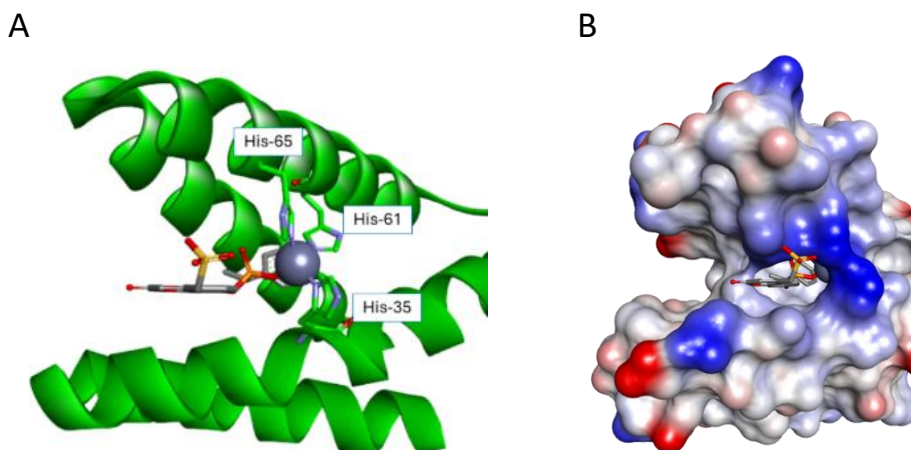
B



Rysunek 19. Struktura NMR minibiałka AlleyCatE (**PDB ID: 4BYA**) ze związanymi jonami Ca²⁺. (A) Reprezentacja wstążkowa z zaznaczoną katalityczną histydyną. (B) Powierzchnia białka pokolorowana zgodnie z wypadkowym ładunkiem. Widoczna jest głęboka wnęka.

W publikacji autorstwa B. Kuhlmana *et al.* zauważono, że obszar kontaktu białko-białko inicjowanego przez jon Zn^{2+} zawiera wnękę przypominającą metalozależne miejsce aktywne.⁹⁵ Otrzymany kompleks **MID1** hydrolizował octan i fosforan 4-nitrofenyłu z przyspieszeniem reakcji równym 104-105. Dalsza analiza strukturalna wykazała, że kompleks stabilizowany był przez dwa miejsca koordynacji jonów cynku przez trzy reszty histydyny.

Wyniki te stanowiły podstawę do dalszych badań, w których monomery **MID1** połączono linkerem Gly-Ser-Gly i usunięto drugie miejsce wiązania cynku.⁹⁶ Otrzymane białko **MID1sc** poddano ukierunkowanej ewolucji. W najbardziej aktywnym wariancie, **MID1sc10**, doszło do zamiany pozycji jednej z histydyn wiążących katalityczny jon metalu (rysunek 20). Wykazano, że katalizuje on hydrolizę estru 2-fenylpropionowego kumaryny z preferencją dla konfiguracji (S).



Rysunek 20. (A) Struktura krystaliczna hydrolazy **MID1sc10** (PDB ID: 5OD1) ze związanym analogiem stanu przejściowego. (B) Powierzchnia **MID1sc10** pokolorowana zgodnie z interpolowanym ładunkiem.

Inny mechanizm opisano w artykule z 2016 roku, w którym aktywność hydrolazowa została wprowadzona do termostabilnej beczułki α , składającej się z 7 α -helis ułożonych wokół tunelu o średnicy 8 Å.⁹⁷ Dobór sekwencji oparto na znanych zasadach projektowania skręconych helis (ang. *coiled coil*) i struktury krystalicznej kompleksu **CC_Hept**. Do sekwencji **CC_Hept** wprowadzono 21 polarnych mutacji

w pozycjach zwróconych w stronę tunelu, obejmujących powtarzające się reszty Cys, Glu i His. Otrzymany wariant **CC_Hept-C-H-E** cechował się wydajnością katalityczną równą $3,7 \pm 0,6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, znacznie niższą niż wcześniej opisany **MID1sc10**.

Znajomość mechanizmu reakcji retroaldolowego rozszczepienia metodolu przez sztuczny enzym **RA95.5-8F** została wykorzystana do przeszczepienia (ang. *grafting*) motywu reszt katalitycznych, Lys-83 i Tyr-51, do C-końcowej domeny **MvaT**. Minibiałko wybrano ze względu na jego krótką, 43-aminokwasową sekwencję, wysoką stabilność termiczną oraz obecność wnęki, oryginalnie służącej do wiązania DNA.⁹¹

Aktywność katalityczna została zaobserwowana dopiero po wprowadzeniu drugiej tyrozyny, której położenie nie odpowiada jednak Tyr-180 w miejscu aktywnym enzymu **RA95.5-8F**. Kolejną kluczową modyfikacją było wprowadzenie fenyloalaniny w obrębie pętli łączącej helisy z β -kartką. Mutacja ta prawdopodobnie zwiększa hydrofobowość wnęki, w której znajduje się lizyna oraz uczestniczy w wiązaniu substratu poprzez oddziaływania π - π .

Następnie minibiałko podzielono na dwie części zgodnie z płaszczyzną prostopadłą do osi wyznaczonej przez reszty Tyr-Lys. Reszty aminokwasowe poddano takim mutacjom, aby ostatecznie otrzymać dziewięć związków o różnym rozkładzie ładunków. Najwyższą aktywność otrzymano dla **peptydu 20** (części o ładunkach 0/+, $k_{cat}/K_M = 0,0081 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) i **peptydu 22** (-/+, $k_{cat}/K_M = 0,0129 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$), co wskazuje na istotną rolę pola katalitycznego w efektywności katalizy.

Zauważono także silną zależność aktywności od *pH*, a obniżenie go z 8 do 7,5 znacznie ją osłabiło. Wyniki te sugerują, że głównym wyzwaniem w przeniesieniu aktywności retroaldolazowej do minibiałkowego rusztowania było zapewnienie skutecznej deprotonacji lizyny, która, pomimo obecności wnęki, pozostaje częściowo wyeksponowana dla rozpuszczalnika.

Termin „minibiałko” stosuje się także w odniesieniu do struktur zawierających niekanoniczne reszty aminokwasowe i modyfikacje łańcucha głównego. W szerokim rozumieniu obejmuje więc foldamery peptydowe składające się z dwóch lub więcej elementów struktury drugorzędowej. Wykorzystanie nienaturalnych reszt

aminokwasowych może sprzyjać odpowiedniemu ułożeniu reszt katalitycznych i umożliwiać wykreowanie środowiska reakcji o pożądanej charakterystyce. W 2009 roku grupy Hilverta i Gellmana zaprojektowały β -peptydowe amfipatyczne helisy, zawierające rząd β 3-homolizyn po jednej stronie, a hydrofobowe reszty cyklicznego β -aminokwasu ACHC (kwasu 2-aminocykloheksanokarboksylowego) po drugiej. W buforze peptydy te samoorganizują się w wiązki helikalne (ang. *helical bundles*).⁴³ Pomimo braku wyodrębnionej wnęki katalitycznej są one zdolne do rozkładu retroaldolowego 4-fenilo-4-hydroksy-2-oksobutyranu zgodne z modelem Michaelisa-Menten, a związek **2** wykazuje 3000-krotne przyspieszenie reakcji w pH = 8, 30 °C. Stała Michaelisa tej cząsteczki to $5,0 \pm 0,6$ mM.

Innym przykładem minibiółkowych peptydomimetyków o aktywności retroaldolazowej są zaprojektowane *de novo* cząsteczki o topologii helisa-linker-helisa, zawierające 9/12/9/10-helisy zbudowane z występujących po sobie L- α -, D- α -aminokwasów, *cis*-(1S,2R)-ACPC i *cis*-(1R,2S)-ACPC.⁹⁸ W trakcie projektowania testowano różne motywy katalityczne, różniące się liczbą lizyn, obecnością reszt zdolnych do katalizy kwasowo-zasadowej, takich jak glutaminian i tyrozyna, a także typem linkera, który ostatecznie zastąpiono sztywnym zwrotem. Zauważono, że aktywność aldolazowa nie była jednoznacznie skorelowana z liczbą reszt lizyny. Peptyd **14**, foldamer o największym przyspieszeniu reakcji ($k_{cat}/k_{uncat} = 1000$), zawierał jedynie jedną lizynę. Pomimo krótkiej sekwencji (19 aminokwasowej) naśladuje on organizację miejsca aktywnego natywnej aldolazy, z resztą Tyr uczestniczącą jednocześnie w transferze protonów i w tworzeniu się środowiska hydrofobowego w pobliżu lizyny.

2. CEL PRACY

Głównym celem niniejszej pracy jest zaprojektowanie, synteza i charakteryzacja minibiałek katalizujących reakcje tworzenia wiązania węgiel-węgiel. Projekt zakłada stworzenie wysoce aktywnych katalizatorów działających w łagodnych warunkach i łączących zalety małowymiarowych organokatalizatorów z białkami.

Zastosowanie względnie krótkich sekwencji (40-50 reszt aminokwasowych) umożliwi racjonalne projektowanie oraz wydajną syntezę na podłożu stałym (SPPS) badanych związków. Z kolei zdolność do zwijania się w złożone struktury trzeciorzędowe zapewni odpowiednią architekturę miejsca aktywnego.

Do badań wybrano reakcję aldolową pomiędzy 4-nitrobenzaldehydem a fenyloacetaldehydem. Wybór ten podyktowany jest podobieństwem mechanistycznym do dobrze scharakteryzowanego procesu retroaldolowego rozszczepienia metodolu (opartego na katalizie iminowej) oraz brakiem doniesień literaturowych dotyczących enzymatycznej katalizy tej reakcji.

Badania podzielono na dwie części. Pierwsza obejmuje modyfikowanie domeny MvaT, znanego minibiałka zawierającego wnękę hydrofobową, która posłuży jako rusztowanie dla centrum aktywnego.

W ramach drugiej części badań zaprojektowane zostaną minibiałka *de novo* o topologiach pozwalających na utworzenie kieszeni katalitycznej. W celu zwiększenia stabilności konformacyjnej minibiałek do fragmentów helikalnych zostaną wprowadzone reszty cyklicznego β -aminokwasu *trans*-ACPC, który usztywnia strukturę i promuje proces zwijania.

3. WYNIKI I DYSKUSJA

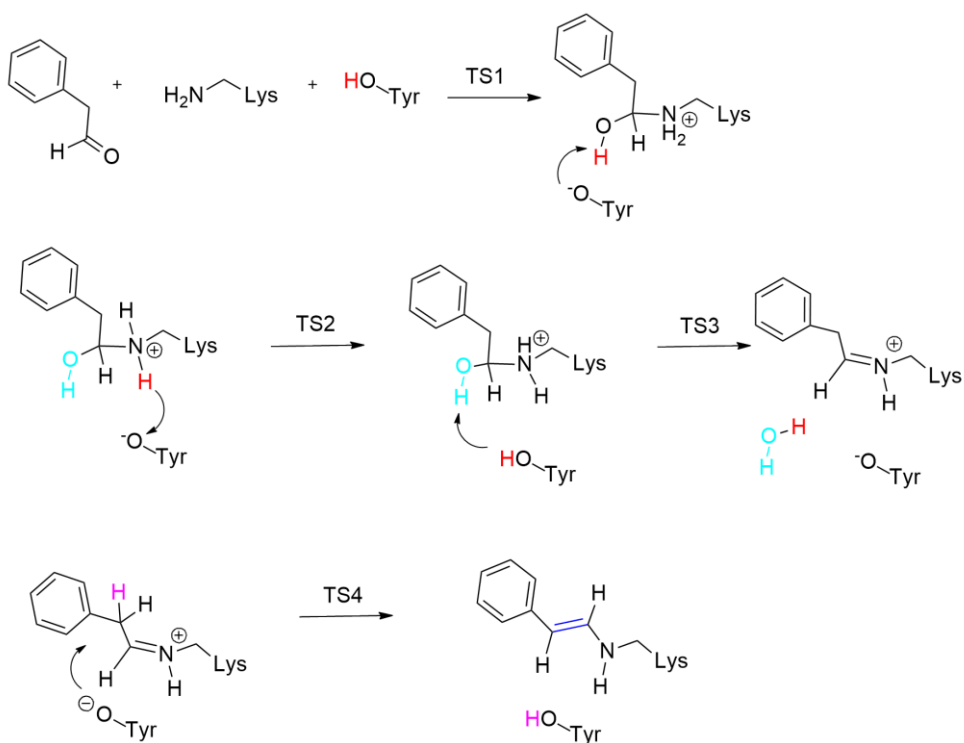
3.1. Mechanizm reakcji

Do badań wybrano reakcję aldolową ze względu na dobrze znany mechanizm reakcji katalizowanej przez aldolazy klasy I i jego pomyślne odwzorowanie w minibiałku **MvaT**. Ponieważ możliwe było wykorzystanie minibiałkowego rusztowania do rozszczepienia aldolowego metodolu, podobna geometria miejsca aktywnego powinna sprawdzić się w reakcji odwrotnej. W zamyśle zaplanowano pójście jednak krok dalej i skupienie się na substratach nie będących modelowymi (tzn. produktami rozpadu metodolu). Założono, że reakcja może zachodzić analogicznie do mechanizmu opracowanego dla metodolu.

Do zajścia reakcji potrzebne są dwa substraty zawierające grupy karbonyłowe. Jeden z nich, który przyłączy się do enzymu jako pierwszy, powinien posiadać wolny proton przy węglu α . Do tej roli wybrano fenyloacetaldehyd; obecność grupy fenyłowej zwiększa powinowactwo cząsteczki do miejsca aktywnego enzymu poprzez oddziaływania hydrofobowe. Związek ten będzie opisywany w pracy jako substrat 1.

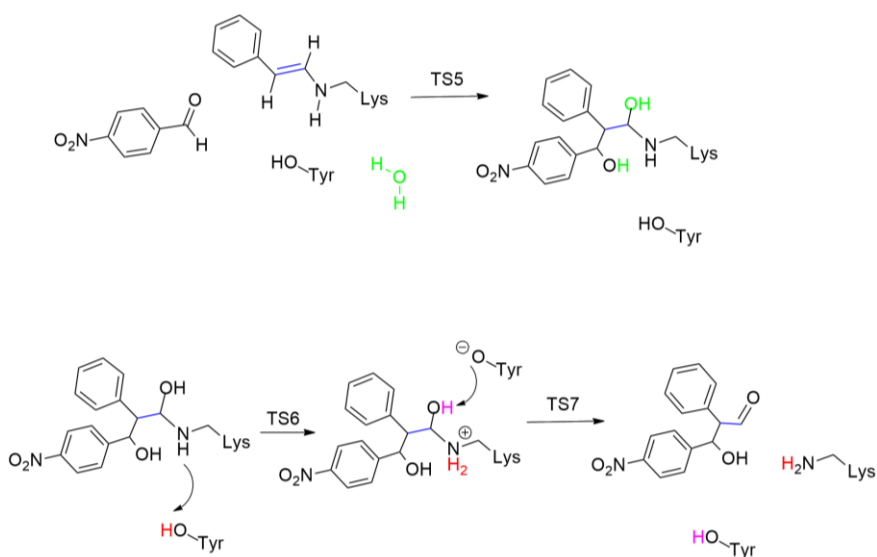
Jako drugi substrat wybrano 4-nitrobenzaldehyd. Nie zawiera on protonu przy węglu α , co zmniejsza prawdopodobieństwo przyłączenia go do enzymu w pierwszej kolejności. Jednocześnie grupa nitrowa zwiększa elektrofilowość atomu węgla karbonyłowego, ułatwiając atak nukleofilowy.

W przypadku reakcji zachodzącej analogicznie do rozszczepienia metodolu przez sztuczny enzym **RA95.5.8F**, reakcja ma charakter wieloetapowy. W pierwszym etapie nukleofilowa grupa NH_2 reszty lizyny atakuje atom węgla grupy karbonyłowej fenyloacetaldehydu, prowadząc do utworzenia się jonu iminiowego (rysunek 21). Reakcja przechodzi przez kilka etapów pośrednich, w trakcie których dochodzi do transferu protonów za pośrednictwem reszty tyrozyny oraz odczepienia się cząsteczki wody. Następnie deprotonacja węgla α prowadzi do powstania enaminowego produktu pośredniego.



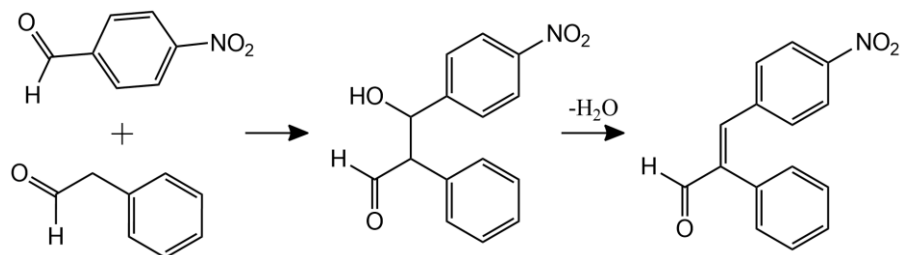
Rysunek 21. Pierwsze cztery etapy reakcji aldolowej.

Enaminowy produkt pośredni pełni funkcję nukleofilu i atakuje atom węgla grupy karbonylowej 4-nitrobenzaldehydu. Na tym etapie kluczowe jest odpowiednie zorientowanie obu substratów w miejscu aktywnym. Węgiel α fenyloacetaldehydu musi być wyeksponowany, a grupa karbonylowa 4- nitrobenzaldehydu znajdować się w jego pobliżu pod odpowiednim kątem. Przyłączenie się drugiego substratu do kompleksu enzym-produkt pośredni towarzyszą dalsze transfery protonów.



Rysunek 22. Etapy 5-7 mechanizmu reakcji aldolowej.

W ostatnim etapie reakcji dochodzi do hydrolizy iminy, odłączenia produktu aldolowego i regeneracji enzymu (rysunek 22). Ponownie uczestniczy w tym reszta tyrozyny, działająca jako donór i akceptor protonu. Otrzymany produkt aldolowy może ulec dehydratacji do odpowiedniego związku α,β -nienasyconego.



Rysunek 23. Dehydratacja produktu aldolowego reakcji.

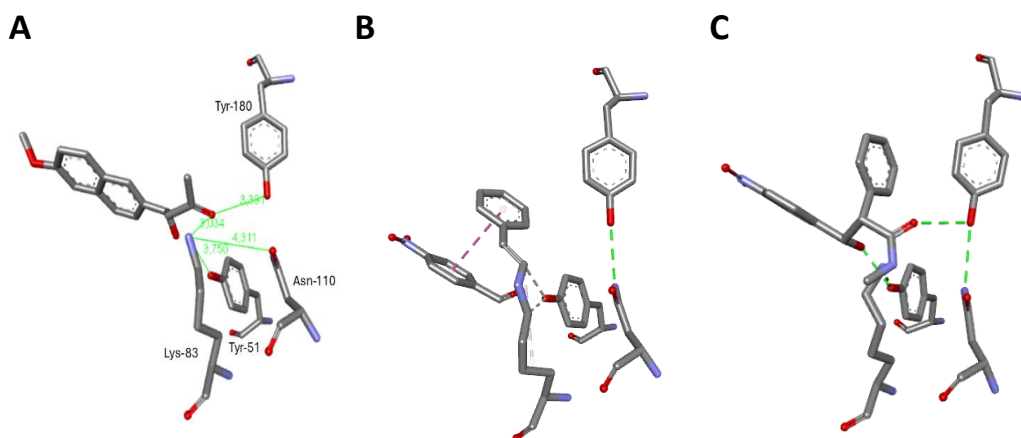
Mechanizm reakcji wymaga, żeby katalityczna reszta lizyny znajdowała się w środowisku obniżającym jej pK_a – w hydrofobowej wnęce lub w sąsiedztwie dodatnio naładowanych reszt.

Geometria przyjęta przez tetradę katalityczną retroaldolazy **RA95.5.8F** jest trudna do odtworzenia w minibiałku, ponieważ Tyr-180 znajduje się nad pozostałymi resztami; spełnienie takiej architektury przy jednoczesnym zachowaniu wnęki jest wyjątkowo

trudne w ok. 50-60 aminokwasowych sekwencjach minibiałek osiągalnych na drodze syntezy chemicznej (rysunek 24).

Tyr-51 oraz Lys-83 są kluczowymi resztami katalitycznymi i ich obecność jest niezbędna do zachowania aktywności enzymu. Tyr-180 i Asn-110 uczestniczą głównie w organizacji miejsca aktywnego oraz w kształtowaniu odpowiedniego środowiska elektrostatycznego; teoretycznie mogą więc zostać zastąpione innymi resztami pełniącymi analogiczne funkcje.

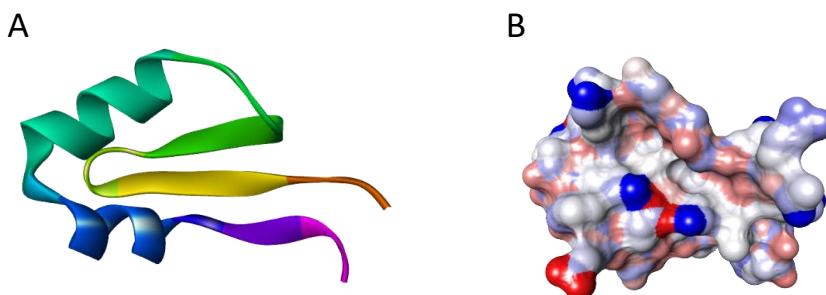
Wieloletowość badanej reakcji znacznie utrudnia wyznaczenie kluczowego stanu przejściowego. W związku z tym skupiono się na pierwszym etapie reakcji, który wymaga związania fenylacetaldehydu w odpowiednim miejscu i zapewnienia obniżonego pK_a lizyny. Do modelowania wykorzystano także produkt pośredni reakcji po przyłączeniu drugiego substratu. Stosowane podejście znacznie obniża koszt obliczeniowy projektowania, możliwe jest jednak doprowadzenie do zbyt sztywnego wiązania produktów pośrednich i związanej z tym inhibicji.



Rysunek 24. Geometria miejsca aktywnego: (A) retroaldolazy **RA95.5-8F** z modelem – zaznaczono także odległości pomiędzy kluczowymi atomami; (B) Przełożenie miejsca aktywnego retroaldolazy **RA95.5-8F**, ale ze związanym fenylacetaldehydem i 4-nitrobenzaldehydem w pozycji ataku. (C) Na miejsce aktywne retroaldolazy **RA95.5-8F** nałożono stan przejściowy reakcji fenylacetaldehydu z 4-nitrobenzaldehydem po związaniu drugiego substratu.

3.2. Katalizatory bazujące na domenie MvaT

Projektowanie rozpoczęto od wyboru nieaktywnego katalitycznie minibiałka, którego struktura sprzyjałaby wprowadzeniu miejsca aktywnego. W tym celu wybrano C-kończową domenę białka **MvaT**, której struktura została opisana w bazie PDB opracowana z zastosowaniem spektroskopii NMR (PDB ID: 2MXE). Jest to natywne minibiałko składające się z dwóch helis połączonych zwrotem, położonych na powierzchni β -kartki. Struktura ta charakteryzuje się wysoką stabilnością termiczną i obecnością wnęki wiążącej DNA, która stanowi obiecujące miejsce na lokalizację miejsca aktywnego. Dodatkowo domena **MvaT** była wcześniej wykorzystana do opracowania katalitycznych minibiałek – retroaldolazy rozszczepienia metodolu i hydrolaz serynowych – potwierdzając jej funkcjonalność.



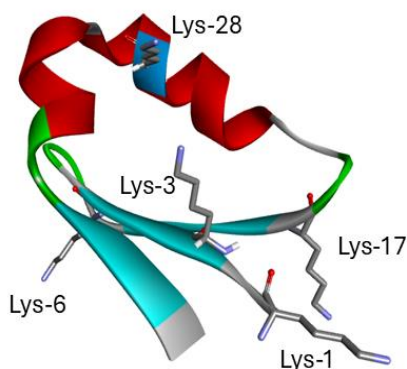
Rysunek 25. Struktura NMR C-końcowej domeny **MvaT**. (PDB ID: 2MXE)

(A) Reprezentacja wstążkowa. (B) Powierzchnia minibiałka pokolorowana zgodnie z wypadkowym ładunkiem.

3.2.1. Wtórne wykorzystanie retroaldolazy bazującej na domenie MvaT

Ze względu na różnice w wielkości i charakterystyce substratów, miejsce aktywne sprzyjające rozszczepieniu metodolu niekoniecznie sprawdziłoby się w reakcji 4-nitrobenzaldehydu z fenyloacetaldehydem. Niemniej jednak podjęto próbę wtórnego wykorzystania **peptydu 20** z przytoczonej w podrozdziale 1.6 publikacji dotyczącej projektowania minibiałkowej retroaldolazy. Związek ten będzie dalej nazywany **MvaT48**. W celu zbadania ewentualnej relokacji miejsca aktywnego przygotowano także analogi tej cząsteczki, w których kolejne lizyny zastąpiono argininami, a także wariant bez żadnych lizyn (sekwencja **MvaT48-0K**), z pojedynczą lizyną w pozycji 3 (minibiałko

MvaT48-3K) lub dwiema lizynami (minibiałko **MvaT48-3K28K**). Szczególną uwagę poświęcono Lys-3 ze względu na jej obecność w kieszeni wiążącej, w sąsiedztwie lizyny odpowiedzialnej za katalizę rozpadu metodolu (rysunek 26). Przyjęto, że usunięcie katalitycznej lizyny spowoduje zauważalny spadek aktywności katalitycznej.



Rysunek 26. Model minibiałka **MvaT48** z zaznaczonym położeniem wszystkich lizyn.

Tabela 3. Sekwencje wariantów minibiałka **Mvat48**. Na niebiesko zaznaczono reszty Lys, a czerwono – Arg.

Minibiałko	Sekwencja
MvaT48	KVKQYKNPYT GQVIQTKFGN HxTYAQWKYx WGPQAVESWA TLL
MvaT48-1R	RVKQYKNPYT GQVIQTKFGN HxTYAQWKYx WGPQAVESWA TLL
MvaT48-6R	KVKQYRNPYT GQVIQTKFGN HxTYAQWKYx WGPQAVESWA TLL
MvaT48-17R	KVKQYKNPYT GQVIQTRFGN HxTYAQWKYx WGPQAVESWA TLL
MvaT48-28R	KVKQYKNPYT GQVIQTKFGN HxTYAQWRYx WGPQAVESWA TLL
MvaT48-3R	KVRQYKNPYT GQVIQTKFGN HxTYAQWKYx WGPQAVESWA TLL
MvaT48-3K28K	RVKQYRNPYT GQVIQTRFGN HxTYAQWKYx WGPQAVESWA TLL
MvaT48-3K	RVKQYRNPYT GQVIQTRFGN HxTYAQWRYx WGPQAVESWA TLL
MvaT48-0K	RVRQYRNPYT GQVIQTRFGN HxTYAQWRYx WGPQAVESWA TLL

x – L-cytrulina

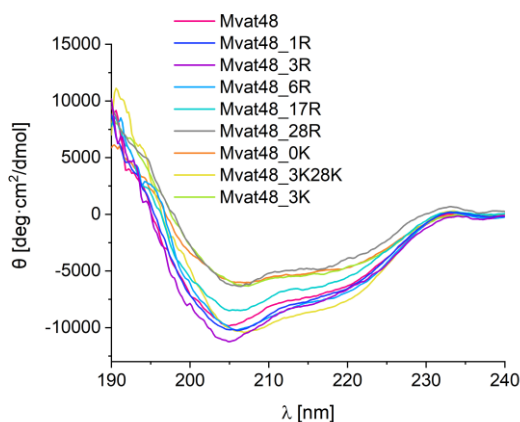
3.2.1.1. Analiza strukturalna

Analizę strukturalną przeprowadzono dla 6 minibiałek, opierając się na pomiarach dichroizmu kołowego (rysunek 27). Eksperyment wykonany w stałej temperaturze umożliwia wstępne określenie procentowego udziału elementów struktury drugorzędowej w badanym minibiałku. W przypadku sigmoidalnego przebiegu krzywej temperaturowej otrzymanej w wyniku pomiaru w czasie stopniowego ogrzewania próbki możliwe jest wyznaczenie temperatury denaturacji i kooperatywności związania się.

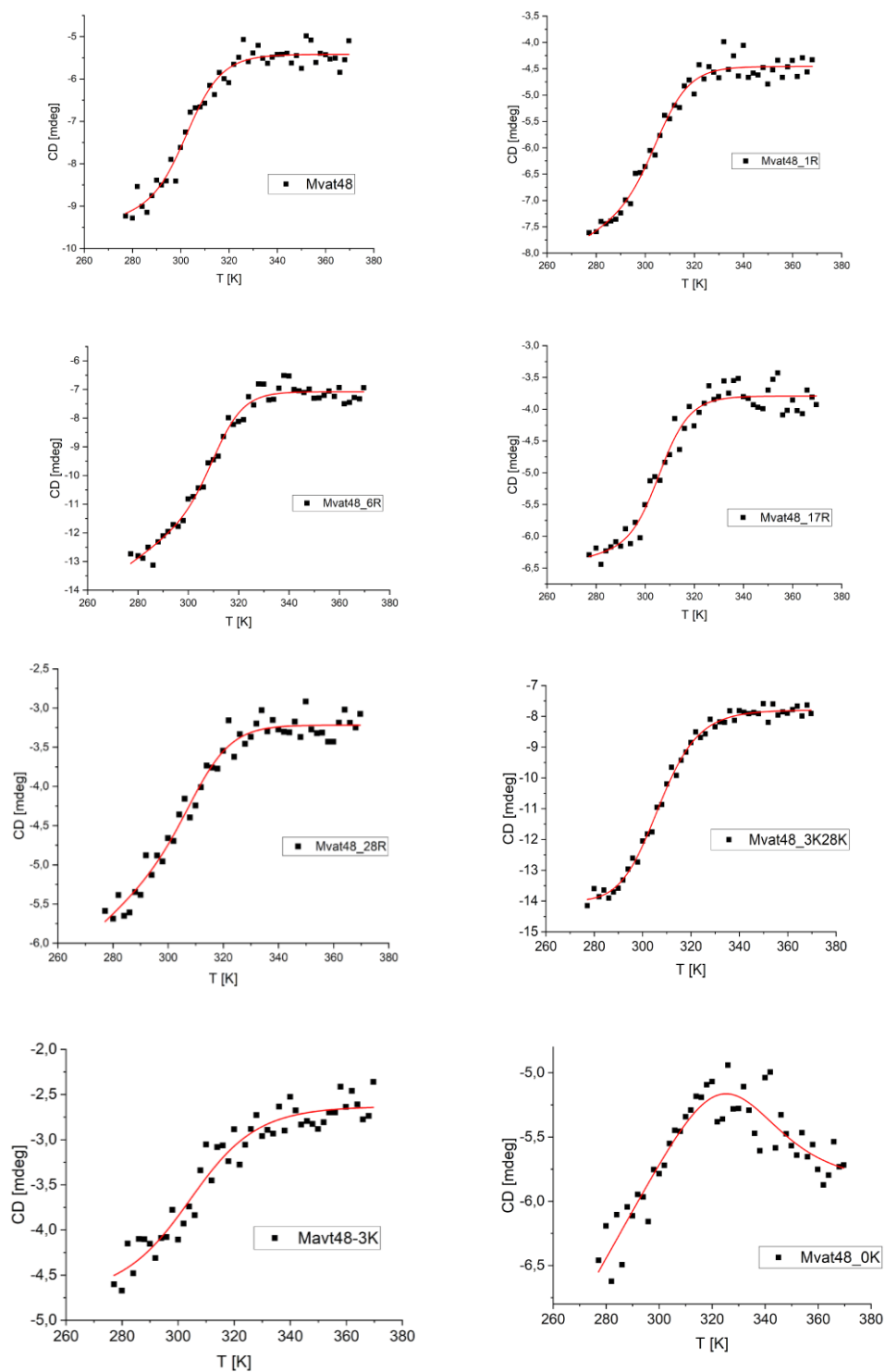
Na widmie związku wyjściowego (**MvatT48**) można wyróżnić dwa sygnały charakterystyczne dla struktur α -helikalnych — minima przypadające na długości fali 206 nm i 222 nm. Kolejny istotny sygnał stanowi maksimum w okolicy $\lambda = 230$ nm, co sugeruje znaczny udział oddziaływań między resztami aromatycznymi. Brak wyraźnie zaznaczonego minimum odpowiadającego strukturze β -kartki może wynikać z nakładania się sygnałów.

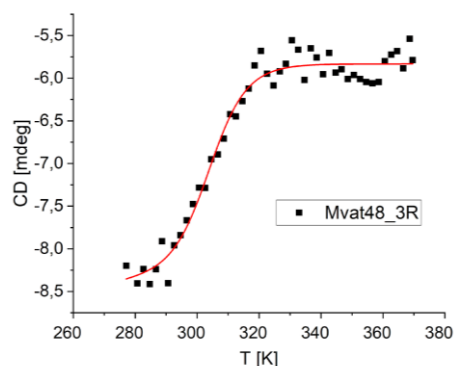
Niezależnie od pozycji w sekwencji zamiana pojedynczej reszty lizyny na argininę nie miała wpływu na kształt krzywej. Ponadto wszystkie badane próbki wykazywały niską stabilność temperaturową — wyznaczone $T_{M,222nm}$ przyjęły wartości od 30 do 39 °C (rysunek 28, tabela 4). Tak niska stabilność może ograniczać przydatność **MvaT48** jako punktu wyjścia do wprowadzania dalszych mutacji, ponieważ istnieje wysokie prawdopodobieństwo zupełnego rozwinięcia struktury na skutek kolejnych mutacji.

Zamiana wszystkich reszt lizyny na argininy skutkowałą destabilizacją struktury. Podczas gdy przebieg widma CD pozostał bez zmian, krzywa denaturacji nie wykazuje charakterystycznego sigmoidalnego kształtu. W rezultacie nie określono $T_{M,222nm}$ tego wariantu. Za efekt ten może odpowiadać tendencja reszt argininy do agregacji.



Rysunek 27. Widma dichroizmu kołowego minibiłek zmierzone w temperaturze 25 °C i w przedziale długości fali 195-240 nm.





Rysunek 28. Krzywe denaturacji temperaturowej minibiałek dla długości fali 222 nm, zmierzone dla 25-50 μM peptydu w 50 mM buforze fosforanowym o pH = 7,4. Czerwona krzywa odpowiada dopasowaniu danych do funkcji obliczającej temperaturę denaturacji.

Tabela 4. Wyznaczone temperatury denaturacji minibiałek dla $\lambda = 222$ nm.

Minibiałko	$T_{M,222 \text{ nm}} [^{\circ}\text{C}]$
Mvat48	$30,7 \pm 4,4$
Mvat48_1R	$33,5 \pm 3,7$
Mvat48_6R	$39,1 \pm 2,3$
Mvat48_17R	$33,4 \pm 3,1$
Mvat48_28R	$39,5 \pm 5,6$
Mvat48_3R	$31,5 \pm 2,8$
MvaT48-3K28K	$33,1 \pm 2,0$
MvaT48-3K	~ 30
MvaT48-0K	brak punktu przegięcia

3.2.1.2. Aktywność katalityczna

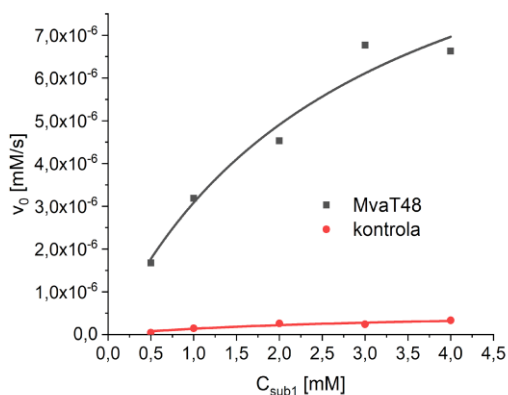
Aktywność katalityczną minibiałek porównywano przy równym stężeniu obu substratów (2 mM) oraz 0,1 mM stężeniu peptydu. Reakcję zatrzymywano po 1 h poprzez dwukrotne rozcieńczenie mieszaniny acetonitrylem, co prowadziło do denaturacji katalizatora. W przypadku wariantu **MvaT48** wyznaczono parametry kinetyczne, mierząc stężenie nienasyconego produktu (nie zaobserwowano pośredniego produktu aldolowego) w warunkach rosnącego stężenia fenyloacetaldehydu (substratu 1)

w zakresie 0,5–4 mM i przy stałym stężeniu 4-nitrobenzaldehydu (substratu 2) równego 2 mM.

Wybór fenyloacetaldehydu jako substratu o zmiennym stężeniu podyktowany był faktem, że wiąże się on z minibiałkiem w pierwszej kolejności i uczestniczy w powstawaniu kluczowego produktu pośredniego. Zakres stosowanych stężeń ograniczono ze względu na spadek rozpuszczalności (wytrącanie się) peptydu oraz nasilającą się reakcję uboczną autokondensacji aldolowej substratu. Należy zaznaczyć, że dla reakcji dwusubstratowych parametry wyznaczone w ten sposób mają charakter pozorny, jednak są w pełni wystarczające do celów porównawczych. Obliczenia kinetyczne (dopasowanie do równania Michaelisa-Menten) przeprowadzono za pomocą oprogramowania OriginPro.

Dla wyjściowej sekwencji odnotowano aktywność katalityczną skutkującą przyspieszeniem reakcji ok. 1600 przy wartości K_M równej $2,9 \pm 1,2$ mM (rysunek 29, tabela 5). Analiza danych otrzymanych dla pozostałych wariantów pozwala jednak określić, że Lys-28 w zaprojektowanym miejscu aktywnym nie jest jedyną lizyną odpowiadającą za jej przebieg (rysunek 30). Usunięcie wszystkich lizyn z sekwencji prowadzi do nieaktywnego wariantu, co potwierdza ich rolę w mechanizmie reakcji, ale zastąpienie Lys-28 nieaktywną arginina nie miało wpływu na jej szybkość. Mutacja K6R także nie doprowadziła do spadku aktywności. Niewielkie obniżenie wydajności zaobserwowano dla mutantu K17R, natomiast wariant K1R wykazał spadek do poziomu około 66% aktywności początkowej. Co ciekawe, minibiałko zawierające pojedynczą lizynę w pozycji 3 zachowuje ponad połowę aktywności, z kolei wariant, w którym występują dwie lizyny 3 i 28 jest w pełni aktywny.

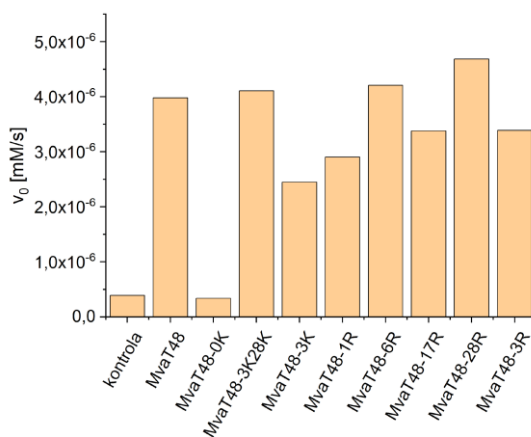
Wyniki te wskazują na wyjątkową plastyczność miejsca aktywnego. W wyjściowym wariantcie najprawdopodobniej dochodzi do współpracy kilku lizyn, w szczególności Lys-1, Lys-3 i Lys-28, a w mniejszym stopniu także Lys-17. Pozbycie się jednej lizyny powoduje przejęcie części funkcji przez pozostałe.



Rysunek 29. Wykres Michaelisa-Menten dla **MvaT48** przy stałym stężeniu 4-nitrobenzaldehydu i rosnącym stężeniu fenylacetalddehydu (0,5 mM-4 mM).

Tabela 5. Parametry katalityczne minibialek obliczone na podstawie dopasowania do modelu Michaelisa-Menten.

minibiałko	k_{cat}/k_{uncat}	K_M [mM]	$k_{cat}/K_M \cdot 10^5$ [1/s·mM]
MvaT48	1559 ± 72	$2,9 \pm 1,2$	$4,1 \pm 1,7$

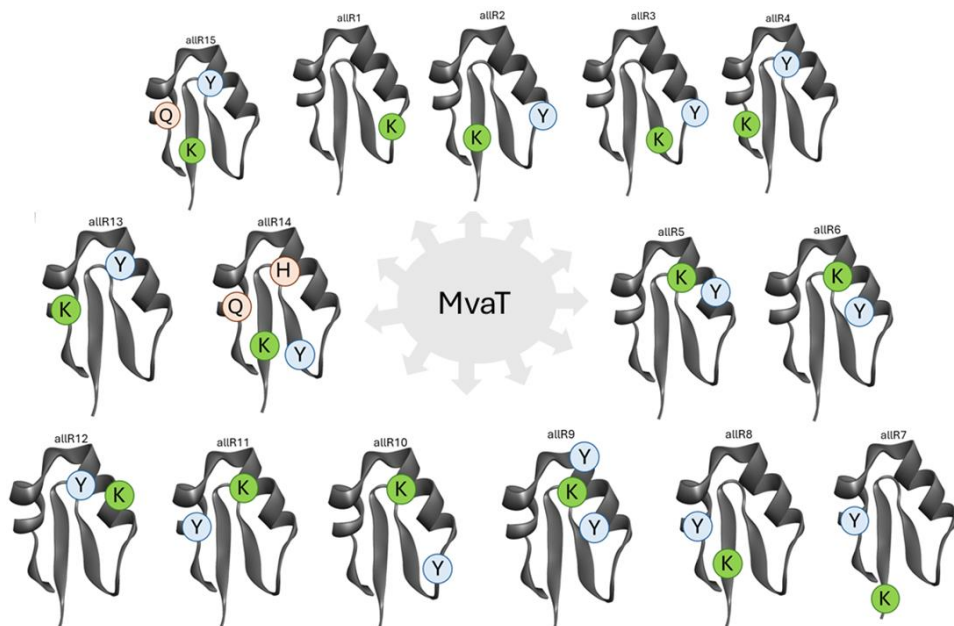


Rysunek 30. Początkowa szybkość reakcji zmierzona dla 0,1 mM minibialka po 1 h, dla równego stężenia substratów (2 mM).

3.2.2. Wybór nowego miejsca aktywnego

Ze względu na problematyczne miejsce wiązania substratu oraz niską stabilność temperaturową model minibiałka został zastąpiony oryginalną domeną **MvaT**. W pierwszym etapie usunięto wszystkie lizyny, zastępując je arginina (sekwencja **allR**). Argininę wybrano zamiast często stosowanej alaniny ze względu na kluczową rolę oddziaływań elektrostatycznych w zwijaniu się minibiałka. W przeciwieństwie do grupy aminowej lizyny grupa guanidynowa nie jest w stanie tworzyć iminy; substytucja ta zachowuje jednak ładunek i zbliżony rozmiar łańcucha bocznego.

Nieaktywny katalityczny wariant **allR** wykorzystano jako punkt wyjścia do mutacji testujących różne architektury miejsca aktywnego (rysunek 31, tabela 6). Do wszystkich analogów wprowadzono lizynę i tyrozynę — z wyjątkiem **allR1**, w projekcie którego założono, że występująca naturalnie Tyr-5 jest w odpowiedniej pozycji do uczestnictwa w katalizie. Unikano wstawiania lizyny w pozycjach 5 i 24 ze względu na wysokie prawdopodobieństwo naruszenia rdzenia hydrofobowego minibiałka, a co za tym idzie, wywołania zmian konformacyjnych. Związki **allR9**, **allR14** i **allR15** zawierają większą liczbę mutacji, które uznano za konieczne do zapewnienia odpowiedniego środowiska katalitycznego, biorąc pod uwagę analizę modelu, powstające oddziaływania oraz wielkość powstałej wnęki. Substytucja E37Q wprowadzona w sekwencjach **allR14** i **allR15** ma na celu zapobieganie powstawaniu nieaktywnego mostka solnego pomiędzy katalityczną lizyną a resztą Glu-37. Z kolei reszta histydyny obecna w **allR14** sprzyja organizacji sieci oddziaływań w obrębie wnęki katalitycznej.



Rysunek 31. Schematyczne przedstawienie mutacji wprowadzonych do minibiałka **MvaT**.

Tabela 6. Sekwencje analogów minibiałka MvaT. Niebieskim kolorem zaznaczono katalityczne reszty Lys, a zielonym – tyrozyny.

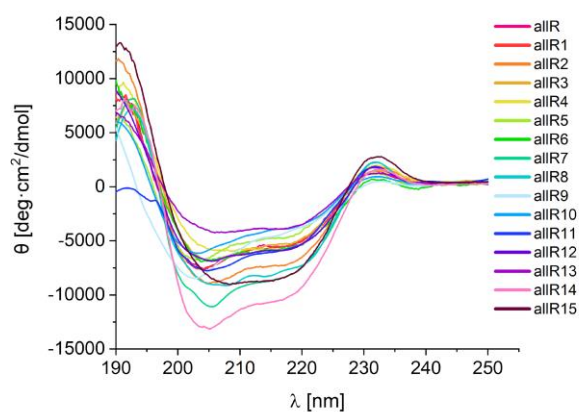
minibiałko	sekwencja
allR	RVRQYRNPHT GEVIETRGGN RRTLREWRAR WGPEAVESW ATLL
allR1	RVRQYRNPHT GEVIETRGGN K RTLREWRAR WGPEAVESW ATLL
allR2	R V K QYRNPHT GEVIETRGGN Y RTLREWRAR WGPEAVESW ATLL
allR3	RVRQYRNPHT GEVIE K R G Y N HRTLREWRAR WGPEAVESW ATLL
allR4	RVRQYRNPHT GEVIETRGGN HRTLREW Y AR WGPEAVESW K TLL
allR5	RVRQYRNPHT GEVIETRGGN HRTL Y EW K AR WGPEAVESW ATLL
allR6	RVRQYRNPHT GEVIETRGGN HRT Y REW K AR WGPEAVESW ATLL
allR7	K V R QYRNPHT GEVIETRGGN HRTLREWRAR WGPEAV Y SW ATLL
allR8	R V K QYRNPHT GEVIETRGGN HRTLREWRAR WGPEAV Y SW ATLL
allR9	RVRQYRNPHT GEVIETRGGN HRTL Y EW K YR WGPEAVESW ATLL
allR10	RVRQYRNPHT GEVIETR G Y GN HRTLREW K AR WGPEAVESW ATLL
allR11	RVRQYRNPHT GEVIETRGGN HRTLREW K AR WGPEAV Y SW ATLL
allR12	RVRQYRNPHT GEVIETRGGN HRTL K EW Y AR WGPEAV K SW ATLL
allR13	RVRQYRNPHT GEVIETRGGN HRTLREW Y AR WGPEAV K SW ATLL
allR14	R V K QYRNPHT GEVIE Y RGGN HRTLREWHAR WGPEAV Q SW ATLL
allR15	R V K QYRNPHT GEVIETRGGN HRTLREW Y AR WGPEAV Q SW ATLL

3.2.2.1 Analiza strukturalna

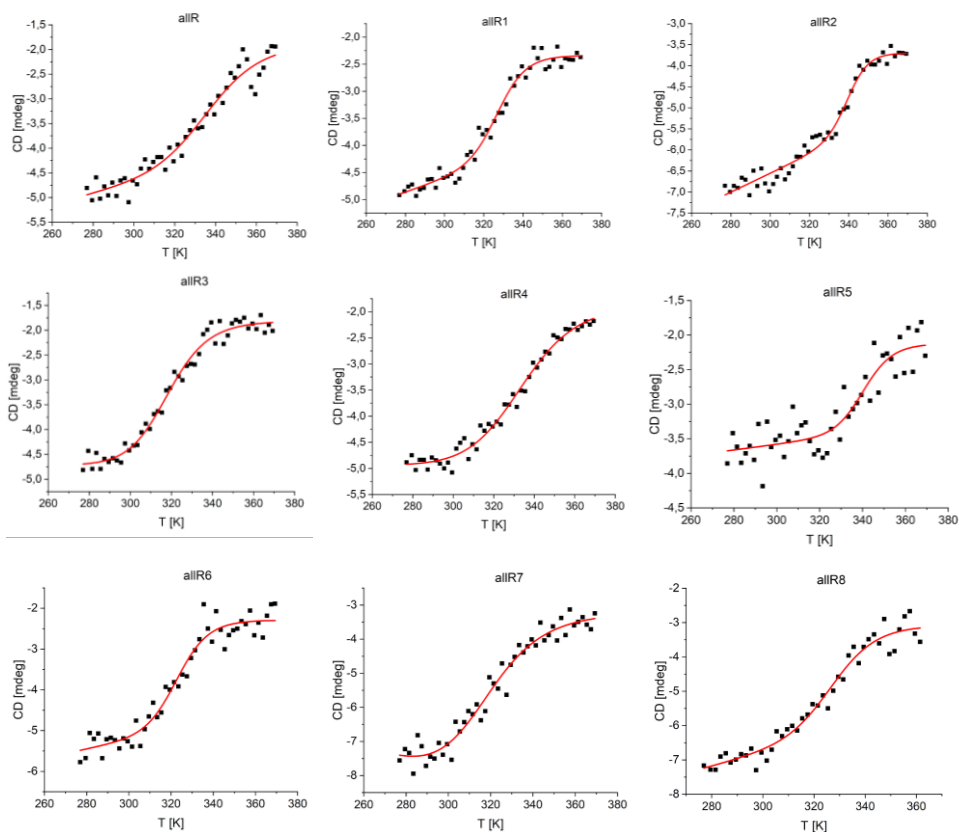
Analizę strukturalną przeprowadzono na podstawie pomiarów dichroizmu kołowego. Widmo CD otrzymane dla wariantu **allR**, w którym wszystkie lizyny zastąpiono arginina, wykazuje obecność dwóch minimów przy długości fali 206 i 222 nm charakterystycznych dla domeny **MvaT** (rysunek 32). Wyniki te wskazują na brak istotnych zmian w drugorzędowej strukturze białka. Co ciekawe, nie doszło też do utraty rozpuszczalności na skutek wprowadzenia reszt arginin. Temperatura denaturacji określona dla $\lambda = 222$ nm wynosi ok. 66 °C, co wskazuje, że otrzymane minibiałko zachowuje stabilność konieczną do wykorzystania go jako rusztowanie do dalszych etapów projektowania.

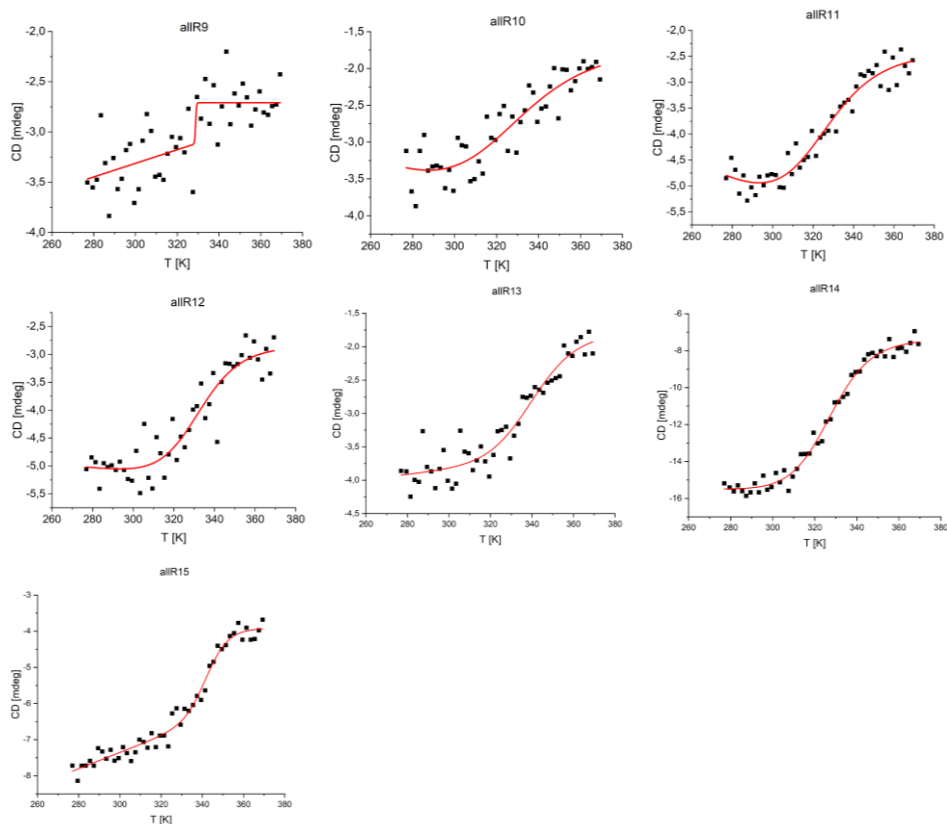
Analogiczny kształt krzywych można zaobserwować dla większości otrzymanych minibiałek; wstawienie reszt katalitycznych do rusztowania **MvaT** na 11 sposobów nie spowodowało zmian strukturalnych wykrywalnych metodą CD. Widoczne odstępstwa od wyjściowej struktury można zauważyć w przypadku związków **allR12**, **allR15**, **allR7** i **allR9**.

Pierwszą kategorię zmian stanowi zrównanie się minimów, które może sugerować częściowe rozwinięcie helisy lub większy udział β -kartki w wariantach **allR12** i **allR15**. Drugi przypadek obserwuje się dla minibiałka **allR7**, w którym minimum w okolicy 205 nm podzieliło się na dwa, sugerując mieszkankę helis α i struktury nieuporządkowanej. Destabilizację konformacji tego wariantu potwierdza obniżenie temperatury denaturacji $T_{M,222}$ poniżej 45 °C (rysunek 33, tabela 7). Podobne przesunięcie można zaobserwować dla wariantu **allR9**, którego $T_{M,222}$ nie mogła zostać wyznaczona ze względu na słaby, zaszumiony sygnał. Z kolei brak wyraźnego maksimum w okolicach 195 nm, obserwowane dla wariantu **allR11**, może wynikać z wysokiego napięcia detektora w trakcie pomiaru.



Rysunek 32. Widma dichroizmu kołowego minibiałek zmierzone w temperaturze 25 °C i w przedziale długości fali 190-250 nm.





Rysunek 33. Krzywe denaturacji temperaturowej minibiałek dla długości fali 222 nm, zmierzone dla 25-50 μM peptydu w 50 mM buforze fosforanowym o pH = 7,4. Czerwona krzywa odpowiada dopasowaniu danych do funkcji obliczającej temperaturę denaturacji.

Tabela 7. Wyznaczone temperatury denaturacji minibiałek dla $\lambda = 222$ nm.

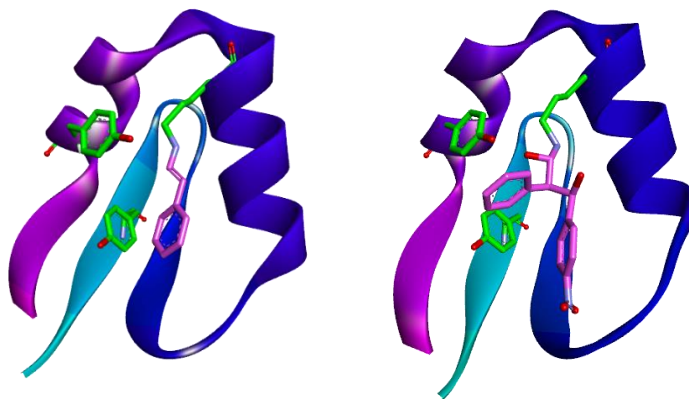
Minibiałko	$T_{M,222 \text{ nm}} [^{\circ}\text{C}]$	Minibiałko	$T_{M,222 \text{ nm}} [^{\circ}\text{C}]$
allR	$66,5 \pm 5,5$	allR8**	$55,9 \pm 3,0$
allR1**	$55,4 \pm 1,8$	allR9	Brak punktu przegięcia
allR2**	$67,5 \pm 1,3$	allR10	~ 50
allR3**	$45,5 \pm 3,2$	allR11	$50,1 \pm 6,5$
allR4**	$61,3 \pm 3,1$	allR12	$59,2 \pm 5,2$
allR5**	$68,1 \pm 3,7$	allR13	$68,5 \pm 4,3$
allR6**	$50,8 \pm 3,0$	allR14	$54,5 \pm 1,8$
allR7**	$43,6 \pm 7,5$	allR15	$69,8 \pm 1,2$

** - peptydy zsyntetyzowane i oczyszczone przez Dr. Manisha Kumara z Katedry Chemii Bioorganicznej, Politechnika Wrocławska

3.2.2.3. Aktywność katalityczna

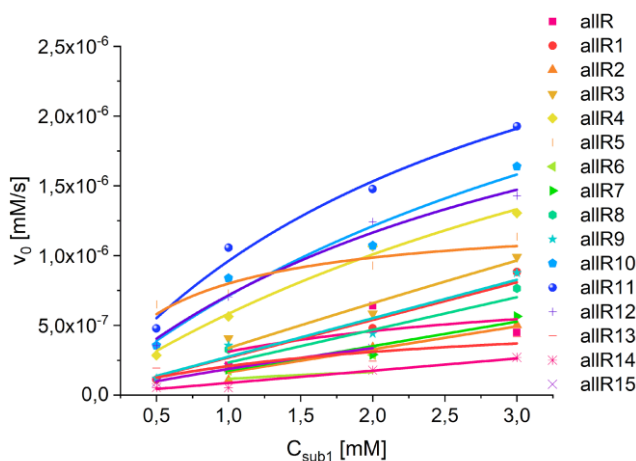
Tak jak w przypadku **MvaT48**, aktywność katalityczną zaprojektowanych minibiałek zmierzono dla reakcji 2 mM 4-nitrobenzaldehydu, fenylactaldehydu w zakresie 0,5-3 mM w obecności 0,1 mM peptydu. Dopasowanie wyników do modelu Michaelisa-Menten w programie OriginPro umożliwiło określenie najlepszych kandydatów do dalszych badań.

Zgodnie z założeniami sekwencja **allR** wykazuje bardzo niską aktywność katalityczną. Zaskakujące jest jednak to, że znalazły się analogi o jeszcze niższej efektywności (rysunek 35). Najprawdopodobniej wynika to z błędu, którym obarczona jest wybrana metoda pomiaru, a który wzrasta, kiedy sygnał jest niski. Analiza krzywych Michaelisa-Menten pozwala jednak wyłonić najlepsze katalizatory. Wariant **allR11** cechuje się wydajnością $1,2 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$, na którą składa się K_M o wartości ok. 3,5 mM i k_{cat}/k_{uncat} ok. 550 (rysunek 35, tabela 8). Skromna wartość przyspieszenia reakcji stanowi dobrą podstawę do kolejnych modyfikacji. Katalityczna lizyna zajmuje w tym wariancie tę samą pozycję, co w **MvaT48**, czyli 28. W jej pobliżu znajdują się dwie tyrozyny: niezmieniona Tyr-5 oraz nowo wprowadzona Tyr-37 (rysunek 34). Pozycja 37 jest o tyle interesująca, że znajdująca się tam poprzednio reszta glutaminianu tworzyła mostek solny z Lys-3. Mutacja E37Y zdaje się jednak nie mieć negatywnego wpływu na stabilność. Możliwe, że reszta ta oddziałuje z Lys-28, Arg-3 lub Tyr-5. Oddziaływanie z Tyr-5 tłumaczyłoby nie tylko stabilizację przyjętej konformacji, ale także poprawę geometrii miejsca aktywnego. Ewentualnie, tyrozyna ta może pełnić funkcję pomocniczą w wiązaniu substratu, a zupełnie inny aminokwas pełni rolę donora/akceptora protonów.



Rysunek 34. Model minibiałka **allR11** ze związanym produktem pośrednim po przyłączeniu fenylacetaldehydu (po lewej stronie) i po przyłączeniu obydwu substratów (po prawej).

Warto zauważyć, że lizynę w tej samej pozycji zawierają warianty **allR5**, **allR6**, **allR9** i **allR10**. Osiągnięte przez nie aktywności są jednak zróżnicowane. Minibiałko **allR10** jest jednym z bardziej aktywnych analogów **MvaT**, jednak o pogorszonej wartości K_M , z kolei **allR5** ma nieco niższe przyspieszenie reakcji, jest jednak bardziej specyficzny. Wariant **allR6** – którego tyrozyna znajduje się w tym samym miejscu co w **Mvat48** - nie wyróżnia się spośród pozostałych. Wyniki te potwierdzają założenie, że położenie tyrozyny jest niezwykle istotne.



Rysunek 35. Wykres Michaelisa-Menten dla minibiałek przy stałym stężeniu 4-nitrobenzaldehydu i rosnącym stężeniu fenylacetaldehydu (0,5 mM-3 mM).

Tabela 8. Parametry katalityczne minibiłek obliczone na podstawie dopasowania do modelu Michaelisa-Menten.

minibiątko	k_{cat}/k_{uncat}	K_M [mM]	$k_{cat}/K_M \cdot 10^5$ [s ⁻¹ ·mM ⁻¹]	$v_0 \cdot 10^6$ [mM·s ⁻¹] dla $C_{sub1} = 3$ mM
allR		Złe dopasowanie		0,45
allR1		Złe dopasowanie		0,88
allR2		Złe dopasowanie		0,50
allR3		Złe dopasowanie		0,99
allR4	487 ± 51	5,4 ± 2,1	0,7 ± 0,3	1,3
allR5	168 ± 6	0,6 ± 0,3	2,1 ± 0,9	1,1
allR6	79 ± 0	2,3 ± 0,7	0,3 ± 0,1	0,33
allR7		Złe dopasowanie		0,56
allR8		Złe dopasowanie		0,77
allR9		Złe dopasowanie		0,88
allR10	533 ± 203	4,7 ± 3,8	0,9 ± 0,7	1,6
allR11	556 ± 17	3,5 ± 0,8	1,2 ± 0,3	1,9
allR12	409 ± 24	3,3 ± 1,2	0,9 ± 0,3	1,4
allR13		Złe dopasowanie		0,42
allR14		Złe dopasowanie		0,27
allR15		Złe dopasowanie		0,55

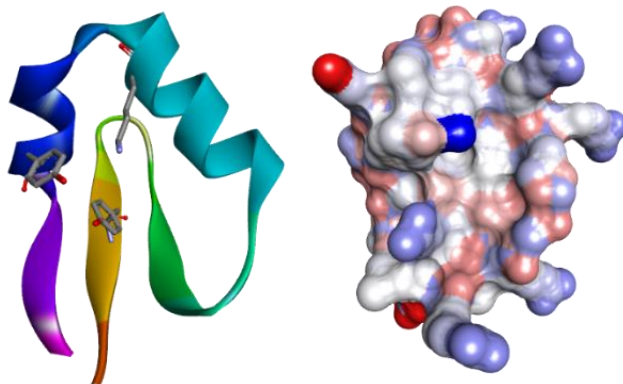
3.2.3. Mutacje w pobliżu miejsca aktywnego

3.2.3.1. Projektowanie

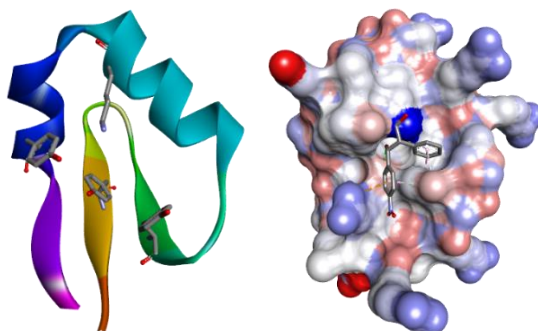
W kolejnym etapie optymalizacji aktywności katalitycznej skupiono się na modyfikacjach okolic miejsca aktywnego w sekwencji minibiłka **allR11**. Wprowadzenie mutacji w pobliżu miejsca aktywnego ma dwa główne cele: zwiększenie hydrofobowości otoczenia lizyny oraz dopasowanie kształtu wnęki do stanu przejściowego reakcji.

Pierwsza strategia polegała na wprowadzeniu hydrofobowej reszty aminokwasowej w pozycji 16, w której oryginalnie znajduje się Thr (rysunek 36). W tym celu przygotowano modele wariantów **allR11Y** i **allR11F**. W tym przypadku położenie substratów byłoby zamienione miejscami w porównaniu z modelem przedstawionym na rysunku 34.

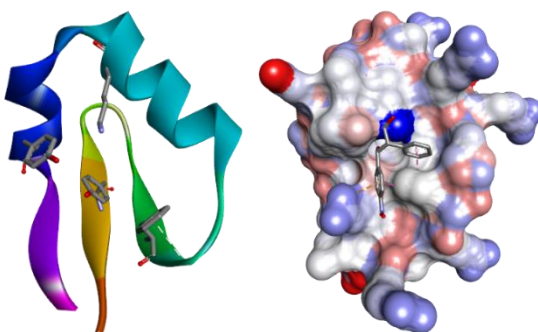
A



B



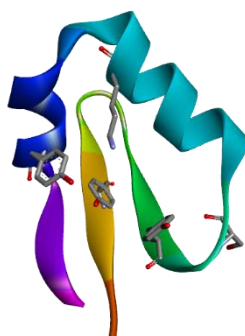
C



Rysunek 36. Wymodelowana struktura minibiałka z miejscem aktywnym w reprezentacji patyczkowej i odpowiadająca mu powierzchnia pokolorowana zgodnie z interpolowanym ładunkiem:

- (A) dla minibiałka **allR11**;
- (B) dla minibiałka **allR11Y**, z zaznaczoną wprowadzoną mutacją T16Y oraz zadokowanym produktem pośrednim;
- (C) dla minibiałka **allR11F**, z zaznaczoną wprowadzoną mutacją T16F oraz zadokowanym produktem pośrednim.

Ze względu na możliwe przesunięcie się łańcucha bocznego dodanej reszty aminokwasowej zdecydowano się także sprawdzić eksperymentalnie wariant **allR11YS**, w którym oddziaływanie z resztą Ser-19 odpowiada za przytrzymanie Tyr-16 w odpowiedniej pozycji. Oddziaływanie nie jest jednoznacznie widoczne na modelu, ale ponieważ Ser-19 znajduje się w regionie o dużej elastyczności, założono, że jest ono prawdopodobne.



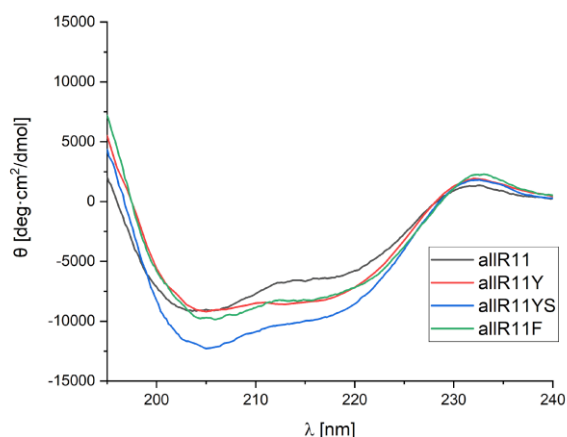
Rysunek 37. Wymodelowana struktura minibiałka **allR11YS** z miejscem aktywnym i wprowadzonymi mutacjami w reprezentacji patyczkowej.

Tabela 9. Sekwencje minibiałek. Zielonym kolorem zaznaczono mutacje.

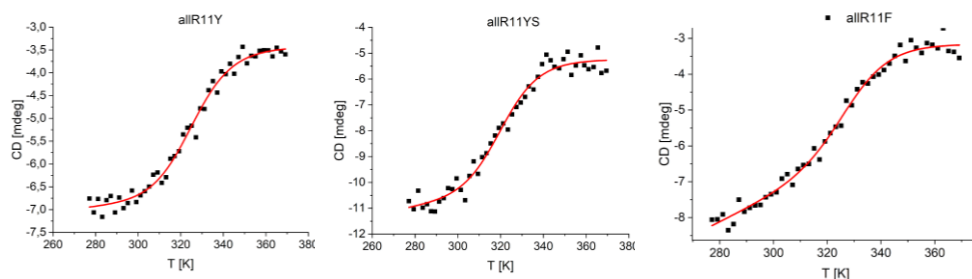
Minibiałko	Sekwencja
allR11	RVRQYRNPHT GEVIETRGGN HRTLREW KAR WGPEAVYSW ATLL
allR11Y	RVRQYRNPHT GEVIEYRGGN HRTLREW KAR WGPEAVYSW ATLL
allR11F	RVRQYRNPHT GEVIEFRGGN HRTLREW KAR WGPEAVYSW ATLL
allR11YS	RVRQYRNPHT GEVIEYRGSN HRTLREW KAR WGPEAVYSW ATLL

3.2.3.2. Analiza strukturalna

Ocenę wpływu mutacji na związanie się minibiałek przeprowadzono za pomocą dichroizmu kołowego. Nałożone na siebie krzywe nie sugerują znacznych zmian strukturalnych (rysunek 38). W przypadku wariantu **allR11Y** doszło do zrównania intensywności dwóch minimów, co może odpowiadać niewielkim zmianom w procentowym udziale helis α i β -katek. Krzywe denaturacji temperaturowej wyznaczone dla długości fali 222 nm są podobne dla wszystkich mutantów, z temperaturą denaturacji przypadającą od 48 do 56 °C (rysunek 39, tabela 10).



Rysunek 38. Widma dichroizmu kołowego minibiałek zmierzone w temperaturze 25 °C i w przedziale długości fali 195 -240 nm.



Rysunek 39. Krzywe denaturacji temperaturowej minibiałek allR11Y, allR11YS i allR11F dla długości fali 222 nm, zmierzone dla 25 μ M peptydu w 50 mM buforze fosforanowym o pH=7,4. Czerwona krzywa odpowiada dopasowaniu danych do funkcji obliczającej temperaturę denaturacji.

Tabela 10. Wyznaczone temperatury denaturacji minibiałek dla $\lambda = 222$ nm.

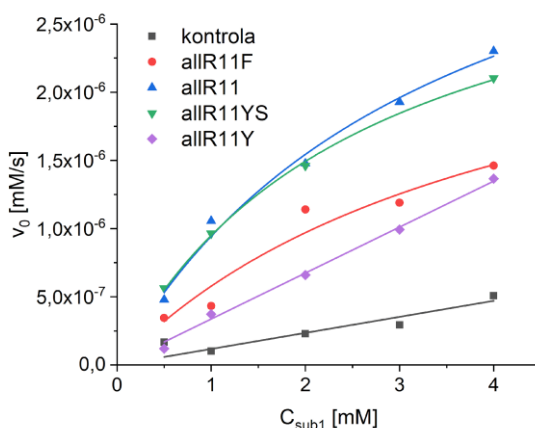
Minibiałko	$T_{M,222\text{ nm}} [^{\circ}\text{C}]$
allR11Y	$53,2 \pm 2,0$
allR11F	$56,5 \pm 2,0$
allR11YS	$48,4 \pm 2,9$

3.2.3.3. Aktywność katalityczna

W konsekwencji wprowadzonych mutacji otrzymano dwa minibiałka, których krzywe katalityczne przebiegają zgodnie z modelem Michaelisa-Menten, oraz jedno o przebiegu liniowym. Prędkość reakcji zmierzone w punkcie $C_{\text{subl}} = 3$ mM wyniosło od

$0,8 \cdot 10^{-6} \text{ mM} \cdot \text{s}^{-1}$ dla najmniej aktywnego wariantu (**allR11Y**) do $1,9 \cdot 10^{-6} \text{ mM} \cdot \text{s}^{-1}$ dla najaktywniejszego, **allR11YS** (rysunek 40, tabela 11).

Liniowa zależność szybkości reakcji od stężenia substratu wskazuje na znaczne obniżenie przyspieszenia reakcji po wprowadzeniu mutacji T19Y i pogorszenie powinowactwa enzymu do substratów. Fenyloalanina w tej samej pozycji także ma negatywny wpływ na katalizę, jednak K_M pozostaje na podobnym poziomie do wyjściowego. W parze z seryną tyrozyna sprawdza się lepiej niż fenyloalanina; parametry kinetyczne dla wariantu **allR11YS** uległy nieznacznej poprawie. Różnicę pomiędzy wariantem **allR11Y** i **allR11YS** może tłumaczyć odpowiednia orientacja grupy bocznej tyrozyny, oddziałującej z grupą hydroksylową seryny.



Rysunek 40. Wykres Michaelisa-Menten dla minibiałek **allR11**, **allR11Y**, **allR11YS** i **allR11F** przy stałym stężeniu 4-nitrobenzaldehydu i rosnącym stężeniu fenyloacetaldehydu (0,5 mM–4 mM). Uwzględniono również kontrolę (reakcję bez katalizatora).

Tabela 11. Wyznaczone pozorne wartości parametrów kinetycznych reakcji katalizowanej przez minibiałka.

Minibiałko	k_{cat}/k_{uncat}	K_M [mM]	$k_{cat}/K_M \cdot 10^5$ [s ⁻¹ ·mM ⁻¹]	$v_0 \cdot 10^6$ [mM·s ⁻¹] dla $C_{sub1} = 3 \text{ mM}$
allR11	556 ± 17	$3,5 \pm 0,8$	$1,2 \pm 0,3$	1,9
allR11Y	Złe dopasowanie			1,0
allR11F	$396,1 \pm 85,6$	$4,2 \pm 2,7$	$0,7 \pm 0,5$	1,2
allR11YS	$457,7 \pm 57,5$	$2,7 \pm 0,2$	$1,3 \pm 0,1$	1,9

3.2.3.4. Dynamika molekularna

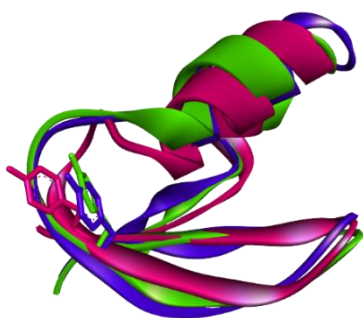
W celu weryfikacji przyjętej hipotezy wykonano symulacje dynamiki molekularnej dla obu minibiałek, **allR11Y** i **allR11YS**, obejmujące czas 27 ns. Za wyjściową strukturę przyjęto model wygenerowany na podstawie sekwencji przy użyciu serwera *ChaiDiscovery*.

W pierwszej kolejności porównano średnie odchylenie kwadratowe atomów C α (ang. *root mean square deviation*, RMSD) względem struktury początkowej minibiałka (tabela 12). Dla wariantu **allR11Y** wartość RMSD ulegała zmianom przez cały czas symulacji, co sugeruje dużą elastyczność struktury. Natomiast struktura **allR11YS** ustabilizowuje się po ok. 2 ns symulacji, wskazując na większą sztywność konformacyjną.

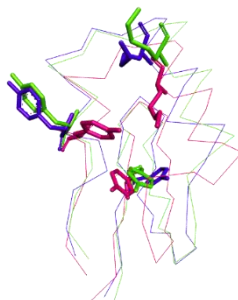
Następnie obliczono średnie fluktuacje kwadratowe atomu C α (RMSF, ang. *root mean square fluctuation*) dla wszystkich reszt aminokwasowych w sekwencji (tabela 13). Analiza ta pozwala skorelować globalne zmiany struktury (RMSD) z konkretnymi rejonami białka. W obu wariantach największe fluktuacje obserwowano dla reszt argininy, pętli łączącej helisy z β -kartką (reszty 17-20) oraz wchodzącą w skład miejsca aktywnego resztę Tyr-37. W przypadku **allR11YS** pętla była jednak mniej ruchliwa, co potwierdza hipotezę, że wprowadzenie reszty seryny w obrębie pętli usztywnia ją i orientuje Tyr-16 (rysunek 41).

Analiza odległości między resztami katalitycznymi Lys-28, Tyr-5 i Tyr-37 wykazała znaczne przesunięcia względem modelu wyjściowego w obu minibiałkach (tabela 12). Wiązania wodorowe w obrębie miejsca aktywnego nie zostały utrzymane, a Lys-28 przesunął się z dala od wnęki katalitycznej. Duże fluktuacje reszty Tyr-37 wskazują, że reszta ta może nie odgrywać bezpośredniej roli w katalizie. Możliwe jest jednak, że związanie pierwszego substratu powoduje zmiany w obrębie miejsca aktywnego. W kolejnych etapach projektowania zdecydowano się skupić na zwiększeniu preorganizacji miejsca aktywnego.

A

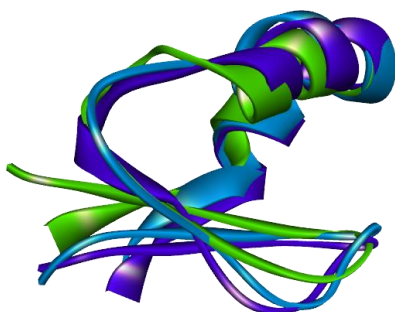


B

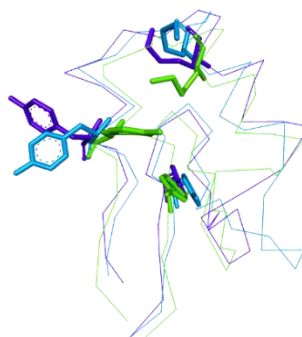


Rysunek 41. Nałożone na siebie struktury **allR11Y**: w czasie 0 ns (magenta), 20 ns (zielony) i 26 ns (fioletowy). (A) W formie patyczkowej przedstawiono Tyr-16. (B) W formie patyczkowej przedstawiono katalityczne reszty aminokwasowe.

A

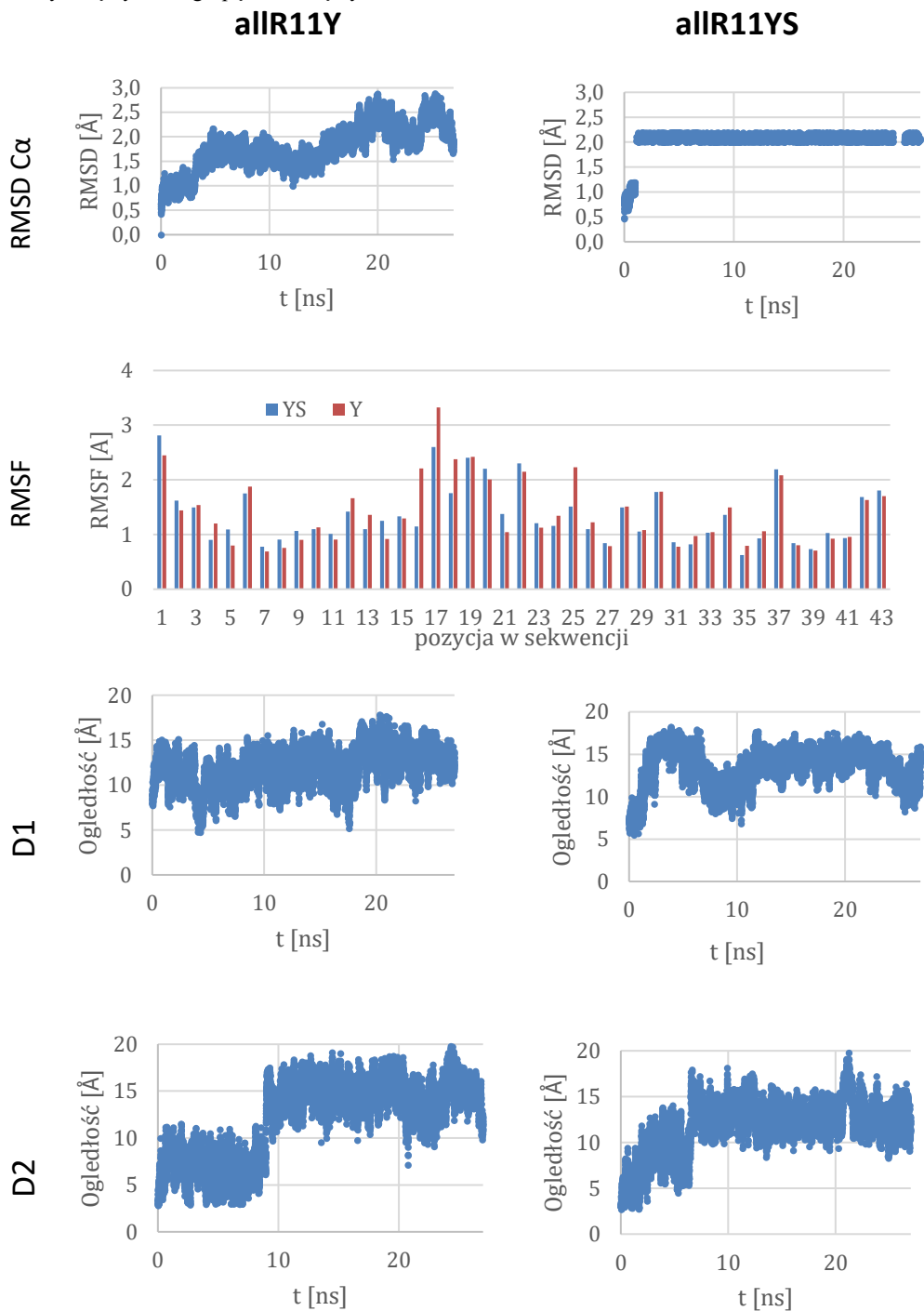


B



Rysunek 42. Nałożone na siebie struktury **allR11Y**: w czasie 0 ns (zielony), 20 ns (niebieski) i 26 ns (fioletowy). (A) W formie patyczkowej przedstawiono Tyr-16. (B) W formie patyczkowej przedstawiono katalityczne reszty aminokwasowe.

Tabela 12. Analiza symulacji dynamiki molekularnej minibiałek **allR11Y** i **allR11YS**. D1 odpowiada odległości między grupą karbonylową Tyr-5 a grupą aminową Lys-28, a D2: odległości między grupą karbonylową Tyr-37 a grupą aminową Lys-28.



3.2.4. Druga iteracja mutacji w pobliżu miejsca aktywnego

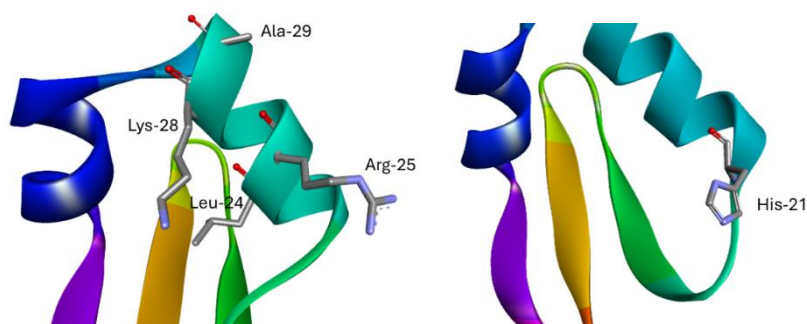
3.2.4.1. Projektowanie

Ze względu na przesunięcie się katalitycznej lizyny z dala od miejsca aktywnego, zdecydowano się na wprowadzenie mutacji mających na celu wymuszenie odpowiedniej pozycji, a jednocześnie obniżenie pK_a grupy ϵ -aminowej.

Pierwszy zaprojektowany mutant, **allR11YSR**, oparto na hipotezie, że wprowadzenie reszty arginy w pozycji 29 nakieruje łańcuch boczny Lys-28 w przeciwną stronę, a dodatnio naładowane otoczenie obniży jej pK_a .

Drugie podejście skupiło się na wprowadzeniu reszty tyrozyny w pozycjach 24, 25 lub 29, które mogłyby stanowić „nakrywkę” na miejsce aktywne, zwiększając jego hydrofobowy charakter (rysunek 43, tabela 13).

Ostatnia wybrana sekwencja zawiera mutację H21Q. Reszta ta jest skierowana w kierunku miejsca aktywnego. Wybór glutaminy wynika z obecności Asn w miejscu aktywnym sztucznego enzymu **RA95.5-8F**. Wprowadzenie grupy amidowej może sprzyjać preorganizacji miejsca aktywnego poprzez tworzenie wiązań wodorowych z pobliskimi resztami, a jednocześnie zmniejsza prawdopodobieństwo udziału reszty histydyny w niepożądanych reakcjach ubocznych.



Rysunek 43. Model mini-białka **allR11YS** z zaznaczonymi resztami aminokwasowymi objętymi mutacjami oraz katalityczną lizyną.

Tabela 13. Sekwencje mini-białek. Na zielono zaznaczono wprowadzone mutacje.

Minibiałko	Sekwencja
allR11YSR	RVRQYRNPHT GEVIEYRGSNH RTLREWKRRW GPEAVYSWATLL
allR11YS-Y24	RVRQYRNPHT GEVIEYRGSNH RTYREWKRARW GPEAVYSWATLL

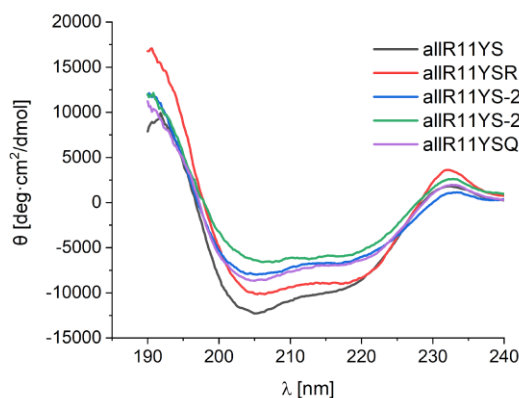
allR11YS-Y25	RVRQYRNPHT GEVIEYRGSNH RTL Y EWKARW GPEAVYSWATLL
allR11YS-Y29	RVRQYRNPHT GEVIEYRGSNH RTLREWK Y RW GPEAVYSWATLL
allR11YSQ	RVRQYRNPHT GEVIEYRGSN Q RTLREWKARW GPEAVYSWATLL

3.2.4.2. Analiza strukturalna

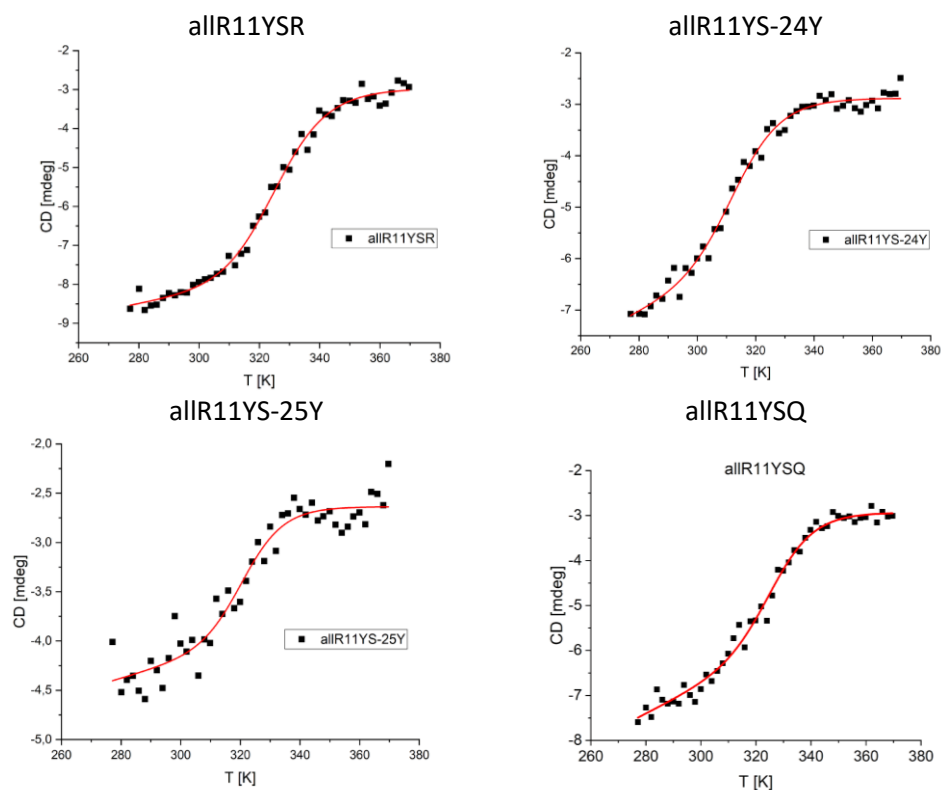
Ze względu na niską rozpuszczalność jednej z próbek (**allR11YS-Y29**) analizę strukturalną przeprowadzono dla czterech z pięciu zaprojektowanych minibiałek. Wprowadzenie tyrozyny w pozycji 29, która jest wyeksponowana na powierzchni minibiałka, znacznie zwiększa jego skłonność do agregacji w roztworach wodnych; w rezultacie wariant ten nie został objęty dalszą analizą.

Widma CD pozostałych związków wykazują niewielkie odchylenia od krzywej wyjściowej (rysunek 44). W przypadku **allR11YSR** i **allR11YS-25Y** można zauważyć pojawiające się wcześniej zrównanie sygnałów. Efekt ten jest jednak niewielki, co wskazuje na duże podobieństwo pomiędzy wszystkimi badanymi analogami.

Stabilność temperaturowa minibiałek, wyrażona temperaturą denaturacji, zawiera się w przedziale 41-54 °C (rysunek 45, tabela 14). Najniższą wartość uzyskano dla wariantu **allR11YS-24Y**. Wyjaśnienia można szukać we wpływie mutacji L24Y na upakowanie rdzenia hydrofobowego minibiałka.



Rysunek 44. Widma dichroizmu kołowego minibiałek zmierzone w temperaturze 25 °C i w przedziale długości fali 195 -240 nm.



Rysunek 45. Krzywe denaturacji temperaturowej minibiałek dla długości fali 222 nm, zmierzone dla 25 μM peptydu w 50 mM buforze fosforanowym o pH = 7,4. Czerwona krzywa odpowiada dopasowaniu danych do funkcji obliczającej temperaturę denaturacji.

Tabela 14. Wyznaczone temperatury denaturacji minibiałek dla $\lambda = 222 \text{ nm}$.

Minibiałko	$T_{M,222 \text{ nm}} [^{\circ}\text{C}]$
allR11YSR	$53,2 \pm 1,3$
allR11YS-Y24	$41,4 \pm 2,7$
allR11YS-Y25	$48,9 \pm 3,5$
allR11YS-Y29	Słaba rozpuszczalność
allR11YSQ	$54,6 \pm 1,8$

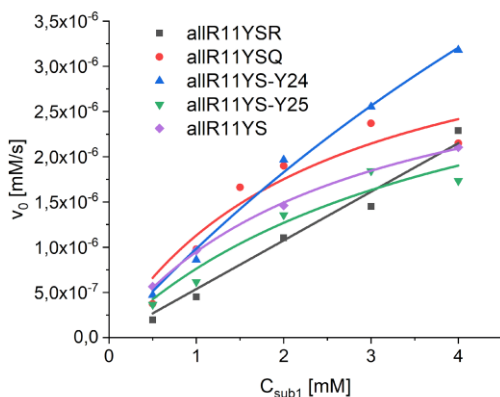
3.2.4.3. Aktywność katalityczna

Pomiary aktywności katalitycznej wykonano dla czterech minibiałek, pomijając związek o niskiej rozpuszczalności (wariant **allR11YS-Y29**). Dla minibiałek **allR11YS-25Y** i **allR11YSQ** otrzymano wykresy zależności szybkości reakcji od stężenia fenylacetaldehydu zgodne z kinetyką Michaelisa–Menten, co pozwoliło na wyznaczenie parametrów V_{max} i K_M . Natomiast dla związków **allR11YSR** i **allR11YS-24Y** zależność jest liniowa, świadcząca o niskim powinowactwie do substratu (rysunek 46, tabela 15).

Analog **allR11YSQ** wykazuje wzrost aktywności katalitycznej przy braku istotnych zmian wartości K_M . Inny efekt można zaobserwować w przypadku **allR11YS-Y24**: mutacja, która została wprowadzona w samym środku miejsca aktywnego, spowodowała pogorszenie dopasowania do substratów i zatrącenie kinetyki Michaelisa–Menten. Podobny przebieg odnotowano dla wariantu **allR11YSR**. Z kolei minibiałko **allR11YS-Y25** charakteryzuje się spadkiem aktywności przy jednoczesnym zachowaniu wartości K_M na poziomie zbliżonym do wariantu wyjściowego, co wskazuje na wpływ mutacji głównie na etap katalityczny, a nie na wiązanie substratu.

Wyniki te sugerują, że modyfikacje w pozycjach 24 i 29 powodują znaczne zmiany w organizacji miejsca aktywnego. W przeciwieństwie do nich mutacje w pozycjach 25 i 21 nie wpływają znacznie na wartość K_M . Zdolność do wiązania substratu zostaje więc zachowana.

Zaobserwowany wzrost szybkości reakcji uzyskany po wprowadzeniu reszty Gln w obrębie pętli łączącej helisę z β -kartką może oznaczać, że uczestniczy ona w mechanizmie katalizy. Grupa amidowa może brać udział w transferze protonów lub stabilizować stan przejściowy. Alternatywnie może mieć pośredni wpływ poprzez pozycjonowanie kluczowych reszt w miejscu aktywnym. Ze względu na obecność tej reszty we fragmencie o dużej elastyczności niewykluczone jest oddziaływanie z resztami oddalonymi od niej w wymodelowanej strukturze.



Rysunek 46. Wykres Michaelisa-Menten przy stałym stężeniu 4-nitrobenzaldehydu i rosnącym stężeniu fenyloacetaldehydu (0,5 mM-4 mM). Uwzględniono również kontrolę (reakcję bez katalizatora).

Tabela 15. Wyznaczone pozorne wartości parametrów kinetycznych reakcji katalizowanej przez minibiałka.

Minibiałko	k_{cat}/k_{uncat}	K_M [mM]	$k_{cat}/K_M \cdot 10^5$ [s ⁻¹ ·mM ⁻¹]	$V_0 \cdot 10^6$ [mM·s ⁻¹] dla $C_{sub1} = 3$ mM
allR11YS	457,7 ± 57,5	2,7 ± 0,2	1,3 ± 0,1	1,9
allR11YSR	Złe dopasowanie			1,4
allR11YS-Y24	Złe dopasowanie			2,5
allR11YS-Y25	497 ± 111	4,0 ± 2,6	1,0 ± 0,6	1,8
allR11YS-Y29	Nie rozpuszcza się w buforze			
allR11YSQ	452 ± 18	1,8 ± 0,9	1,9 ± 0,9	2,4

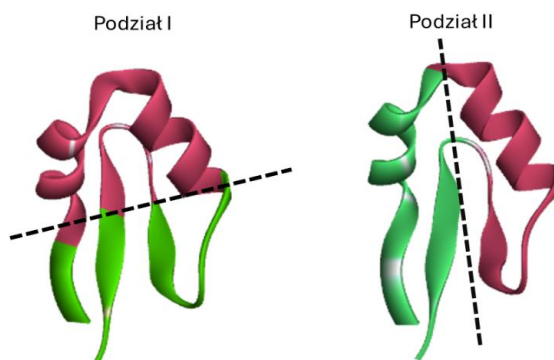
3.2.5. Modulacja ładunków na powierzchni

3.2.5.1. Projektowanie

Pole katalityczne wywiera największy wpływ na etapy reakcji związane ze zmianą momentu dipolowego. W przypadku reakcji aldolowej, przebiegającej zgodnie z opisanym wcześniej mechanizmem, można wyróżnić dwa kluczowe etapy. Pierwszym z nich jest przesunięcie elektronów w trakcie powstawania iminy, w której korzystna jest stabilizacja częściowego ładunku ujemnego na azocie Lys oraz częściowego dodatniego na węglu karbonylu fenyloacetaldehydu. Drugim istotnym etapem jest powstanie wiązania C-C i związane z tym narastanie ujemnego ładunku na atomie węgla α elektrofilowego aldehydu. W tym przypadku stabilizacja ujemnego ładunku jest wspomagana przez silny efekt elektronoakceptorowy grupy NO₂ w 4-nitrobenzaldehydzie.

Do dalszych badań wybrano minibiałko **allR11YSQ**, które poddano mutacjom mającym na celu wybór optymalnego rozkładu ładunków elektrostatycznych w jego

obrębie. Strukturę podzielono na dwa sposoby: wzdłuż osi katalitycznej reszty lizyny lub prostopadle do niej (rysunek 47). Następnie modyfikowano reszty aminokwasowe obdarzone ładunkiem tak, aby uzyskać fragmenty o wypadkowym ładunku dodatnim, ujemnym lub neutralnym. W ten sposób manipulowano polem elektrycznym wywieranym przez enzym na miejsce aktywne.



Rysunek 47. Podział minibiałka **allR11YSQ** na części o różnych ładunkach.

Tabela 16. Sekwencje analogów **allR11YSQ** z modyfikowanym rozkładem ładunków i przypisany im podział na części. Na czerwono zaznaczono wybrane reszty w obrębie części o negatywnym ładunku, a na niebiesko – pozytywnym.

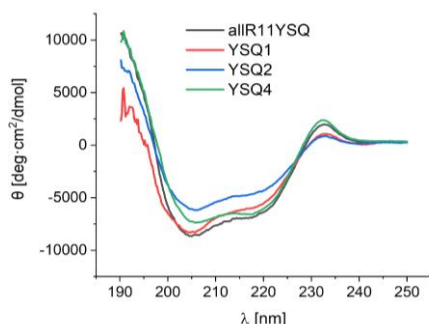
Minibiałko	Podział	Rozkład ładunków	Sekwencja
YSQ1	II	-/+	EV R QY X NP Y TG Q VI Q Y R GSN Q R T L R QWKA R WG P E A VYS WATLL
YSQ2	II	+/-	R VRQY R NP H TGEVIEY X GSN Q X TL X EWKA X WGP Q AVYS WATLL
YSQ3	I	+/-	R VRQY X NP Y TGEV Q Y R GSN Q R TL X EWKA X WGP E AVYS WATLL
YSQ4	I	-/+	X VRQY R NP H TGEVIEY X GSN Q X TL R QWKA R WG P Q AVYS WATLL

X – L-cytrulina

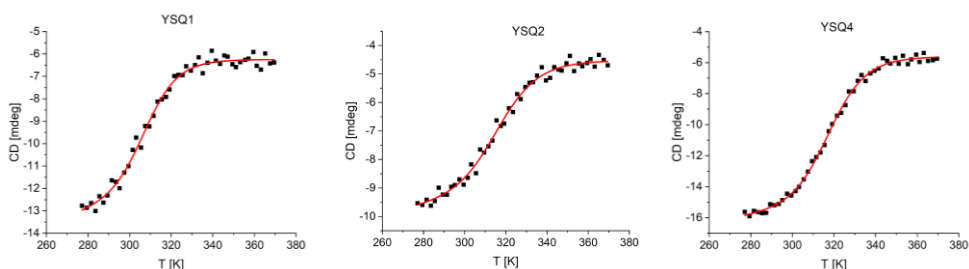
3.2.5.2. Analiza strukturalna

Wpływ wprowadzonych mutacji na strukturę minibiałek oceniono metodą CD. Analiza wariantu YSQ3 okazała się niemożliwa ze względu na słabą rozpuszczalność w buforze. Profile CD pozostałych minibiałek nie odbiegają znacznie od krzywą CD początkowego peptydu (rysunek 48). Zaobserwowano jednak wyraźny spadek temperatury denaturacji z ok. 54 °C dla minibiałka **allR11YSQ** do ok. 36 °C dla wariantu **YSQ1** (tabela 17, rysunek 49). Najprawdopodobniej wynika to z naruszenia oddziaływań

elektrostatycznych i mostków solnych, które przyczyniają się do stabilności konformacyjnej minibiałka.



Rysunek 48. Widma dichroizmu kołowego minibiałek zmierzone w temperaturze 25 °C i w przedziale długości fali 190 -250 nm.



Rysunek 49. Krzywe denaturacji temperaturowej minibiałek dla długości fali 222 nm, zmierzone dla 25-50 μM peptydu w 50 mM buforze fosforanowym o $\text{pH} = 7,4$. Czerwona krzywa odpowiada dopasowaniu danych do funkcji obliczającej temperaturę denaturacji.

Tabela 17. Wyznaczone temperatury denaturacji minibiałek dla $\lambda = 222$ nm.

Minibiałko	$T_{M,222 \text{ nm}} [^{\circ}\text{C}]$
YSQ1	$35,7 \pm 2,7$
YSQ2	$44,6 \pm 2,7$
YSQ3	Słaba rozpuszczalność
YSQ4	$45,6 \pm 1,1$

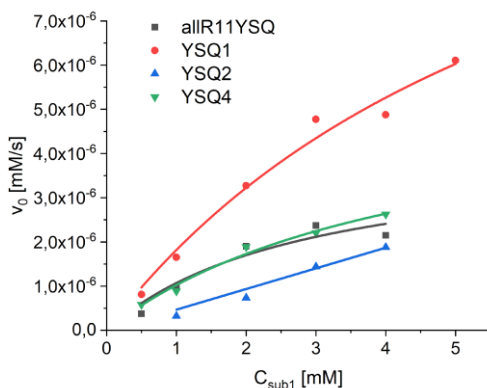
3.2.5.3. Aktywność katalityczna

Zaobserwowano, że zmiany momentu dipolowego minibiałka istotnie wpływają na jego aktywność katalityczną (rysunek 50). W szczególności podział minibiałka w sposób II (rysunek 47) prowadził do 4-krotnego zwiększenia przyspieszenia reakcji, z ok. 450

(wariant **allR11YSQ**) do ok. 1850 (wariant **YSQ1**). Może to sugerować, że kierunek wektora momentu dipolowego tego związku sprzyja transferowi elektronów w etapie tworzenia iminy lub stanowi jego istotną składową. Z kolei wariant charakteryzujący się przeciwnym rozkładem ładunków wykazywał obniżoną aktywność katalityczną.

Wypadkowy moment dipolowy, który otrzymano dla wariantu **YSQ4**, nie różni się znacznie od początkowego (rysunek 51), a dane uzyskane dla tego wariantu są bardzo zbliżone do minibiałka **allR11YSQ**. Ponieważ odwrotny układ nie został zbadany ze względu na słabą rozpuszczalność próbki, nie można ocenić, czy byłby on korzystniejszy dla katalizy.

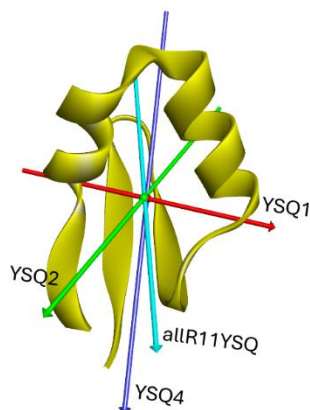
Warto zaznaczyć, że obserwowane efekty mogą wynikać z lokalnych oddziaływań elektrostatycznych w pobliżu miejsca aktywnego. W rezultacie możliwa jest zmiana architektury miejsca aktywnego lub orientowania substratów. Pogorszenie wartości K_M w przypadku wariantu **YSQ2** i – w mniejszym stopniu – **YSQ1** może wynikać z naruszenia oddziaływań, które pełniły kluczową rolę w wiązaniu substratów.



Rysunek 50. Wykres Michaelisa-Menten przy stałym stężeniu 4-nitrobenzaldehydu i rosnącym stężeniu fenyloacetaldehydu (0,5 mM-4 mM).

Tabela 18. Wyznaczone pozorne wartości parametrów kinetycznych reakcji katalizowanej przez minibiałka.

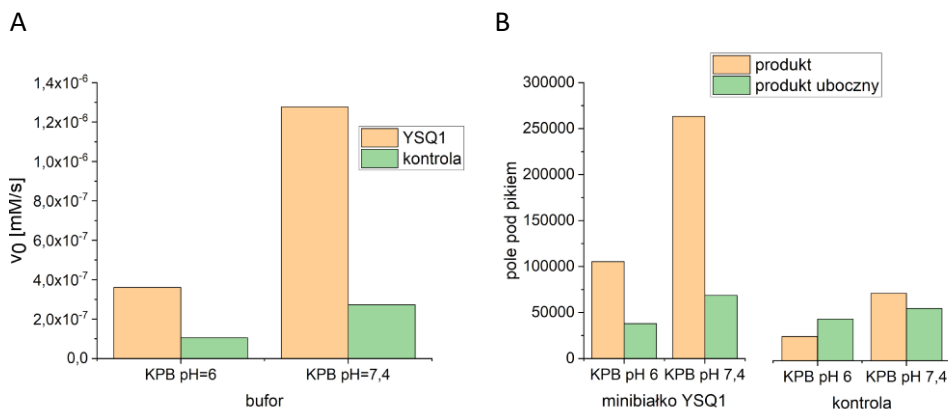
Minibiałko	k_{cat}/k_{uncat}	K_M [mM]	$k_{cat}/K_M \cdot 10^5$ [s ⁻¹ ·mM ⁻¹]	$v_0 \cdot 10^6$ [mM·s ⁻¹] dla $C_{sub1} = 3$ mM
allR11YSQ	452 ± 18	1,8 ± 0,9	1,9 ± 0,9	2,4
YSQ1	1874 ± 178	6,9 ± 2,7	2,1 ± 0,8	4,8
YSQ2	Złe dopasowanie			1,4
YSQ3	Nie rozpuszcza się w buforze			
YSQ4	730 ± 29	4,4 ± 1,5	1,3 ± 0,4	2,6



Rysunek 51. Wektory momentu dipolowego obliczone względem środka geometrycznego minibiałka.

Dla minibiałka **YSQ1** zmierzono dodatkowo v_0 (dla 1 mM stężenia fenyloacetaldehydu) w pH 6 (rysunek 52). Zaobserwowane obniżenie aktywności katalitycznej w buforze o obniżonym pH wskazuje na kluczowe znaczenie utrzymania odpowiedniej nukleofilowości katalitycznej lizyny. Wynik ten stanowi pośrednie potwierdzenie mechanizmu reakcji przebiegającego z udziałem zasady Schiffa.

Kolejne badanie uzupełniające polegało na porównaniu stosunku ilościowego produktu głównego (nienasyconego) do produktu ubocznego, powstającego w wyniku spontanicznej autokondensacji fenyloacetaldehydu. Po 4 godzinach niekatalizowanej reakcji stosunek ten wynosił 0,6 w pH 6 oraz 1,3 w pH 7,4. W przypadku reakcji katalizowanej przez minibiałko **YSQ1** zaobserwowano wyższe wartości: 2,7 (pH 6) oraz 3,8 (pH 7,4). Warto także zauważyć, że pole pod sygnałem odpowiadającym produktowi ubocznemu na chromatogramie pozostaje prawie niezmiennie w porównaniu z próbą kontrolną. Oznacza to, że peptyd nie katalizuje autokondensacji; produkt uboczny powstaje jedynie na drodze spontanicznej reakcji w roztworze.



Rysunek 52. (A) Porównanie początkowej szybkości reakcji (1 h) katalizowanej przez minibiałko **YSQ1** w 50 mM buforze fosforanowym o pH 6 i 7,4. (B) Pole pod sygnałem odpowiadającym produktowi katalizy i produktowi autokondensacji fenyloacetaldehydu w pH 6 i pH 7,4.

3.2.6. Podsumowanie

Pierwsza część badań objęła 37 sekwencji minibiałek, które zsyntetyzowano, oczyszczono i scharakteryzowano. Próba wykorzystania retroaldolazy **MvaT48** do katalizy nowej reakcji, kondensacji aldolowej 4- nitrobenzaldehydu z fenyloacetaldehydem, zaowocowała obiecującą wartością k_{cat}/k_{uncat} . Reakcja ta nie przebiegała jednak w oczekiwany sposób, a rola poszczególnych reszt lizyny okazała się nieoczywista.

W rezultacie zaproponowano i przetestowano 14 alternatywnych architektur miejsca aktywnego, które wprowadzono do nieaktywnego rusztowania domeny MvaT. Modyfikacje wprowadzone w pobliżu centrum aktywnego jedynie nieznacznie poprawiły parametry kinetyczne minibiałka. Istotny przyrost efektywności katalitycznej zaobserwowano dopiero na skutek zmiany rozkładu ładunków na powierzchni minibiałka. Czterokrotny wzrost parametru k_{cat}/k_{uncat} łączył się jednak ze wzrostem K_M , co sugeruje naruszenie geometrii miejsca aktywnego na skutek wprowadzonych mutacji.

Przeprowadzone badania eksponują ograniczenia wynikające z wykorzystania natywnych rusztowań minibiałkowych do wprowadzenia nowej aktywności katalitycznej. Mutacje w obrębie wnęki hydrofobowej często prowadzą do destabilizacji struktury, a katalityczne reszty aminokwasowe są wstawiane do nieprzystosowanego do nich rusztowania. Ponadto analiza efektów mutacji za pomocą dichroizmu kołowego jest

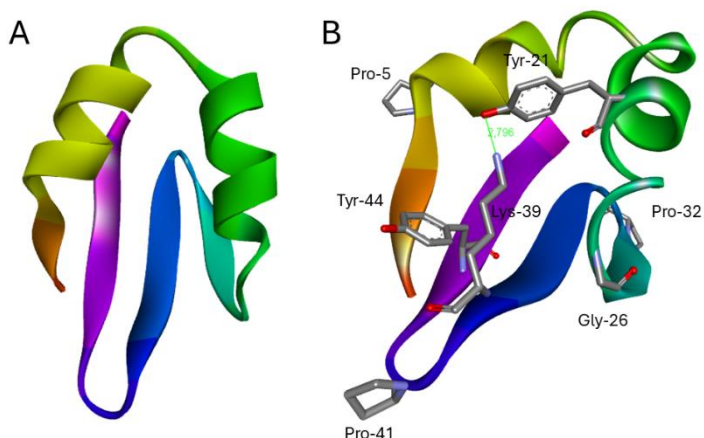
niewystarczająca, ponieważ nie gwarantuje utrzymania poprawnej struktury trzeciorzędowej. W rezultacie efekt mutacji jest często trudny do przewidzenia.

3.3. Minibiałka *de novo* o topologii HHEEE

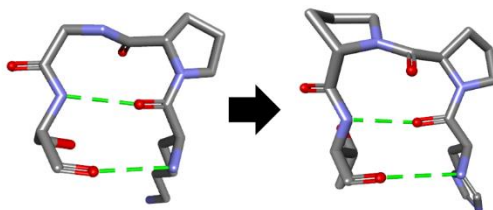
3.3.1 Projektowanie

Projektowanie pierwszego zestawu minibiałek katalitycznych *de novo* oparto na hipotezie, że możliwe jest utworzenie wnęki pomiędzy dwoma helisami wchodzącymi w skład motywu helisa-zwrot-helisa. Poprawne związanie się tych struktur miało być zapewnione dzięki dodatkowi β -kartki, tworzącej razem z helisami wnętrze hydrofobowe. Dodatkowo wykorzystano helisy zawierające cykliczny β -aminokwas *trans*-ACPC, występujący po jednej stronie helisy, zgodnie z motywem $\beta\alpha\alpha\beta\alpha\alpha$.⁹⁹

Łańcuch główny zbudowano z fragmentów istniejących białek, które złożono w jedną strukturę przy pomocy programu Discovery Studio. Kąty torsyjne poprawiono z wykorzystaniem protokołu Rosetta Blueprint, szczególnie w obrębie pętli. Do wygenerowania sekwencji użyto protokołu Rosetta FastDesign, wykorzystując opcję wykluczenia z projektowania niektórych pozycji w sekwencji. Pozycje te obejmowały Lys-39, Tyr-21 i Tyr-44, które przyjęto jako załączek miejsca aktywnego, a także reszty proliny na zakrętach β -kartki i znajdujące się w pętlach Pro-5 i Gly-26 (rysunek 53). Sekwencję o najlepszej ocenie (ang. *score*) wybrano do dalszych etapów badań (minibiałko **O2**), a w celu sprawdzenia wpływu reszt *trans*-ACPC na związanie się zsyntetyzowano także wariant, w którym zostały one zastąpione alaninami (**O1**). W celu zwiększenia sztywności konformacyjnej zsyntetyzowano także analog **O3**, w którym zamieniono motyw β -zwrotu z L-Gly-L-Pro na bardziej restrykcyjny konformacyjnie D-Pro-L-Pro (rysunek 54).



Rysunek 53. Model zaprojektowanego minibiałka **O2** w postaci wstążkowej (**A**) z kolorystycznym zaznaczeniem N- i C-końców. Pomarańczowy kolor wstęgi symbolizuje początek sekwencji, a fioletowy – jej zakończenie. (**B**) Reprerentacją patyczkową zaznaczono reszty aminokwasowe, które nie ulegały zmianie podczas generowania sekwencji.



Rysunek 54. Model zwrotu L-Gly-L-Pro i L-Pro-D-Pro przedstawiony w reprerentacji patyczkowej. Wiązania wodorowe zostały oznaczone przerywaną zieloną kreską.

Tabela 19. Sekwencje minibiałek **O1-O3**.

minibiałko	sekwencja
O1	KVEYPQARKL AEQTPNRAEE YAQKAGNVTK KPGTYEWTKG PQQYTATQ
O2	KVEYPQ●RKL ●EQTPNR●EE Y●QKAGNVTK KPGTYEWTKG PQQYTATQ
O3	KVEYPQ●RKL ●EQTPNR●EE Y●QKAGNVTK KpPTYEWTkp PQQYTATQ

● - *trans*-ACPC

p – D-prolina

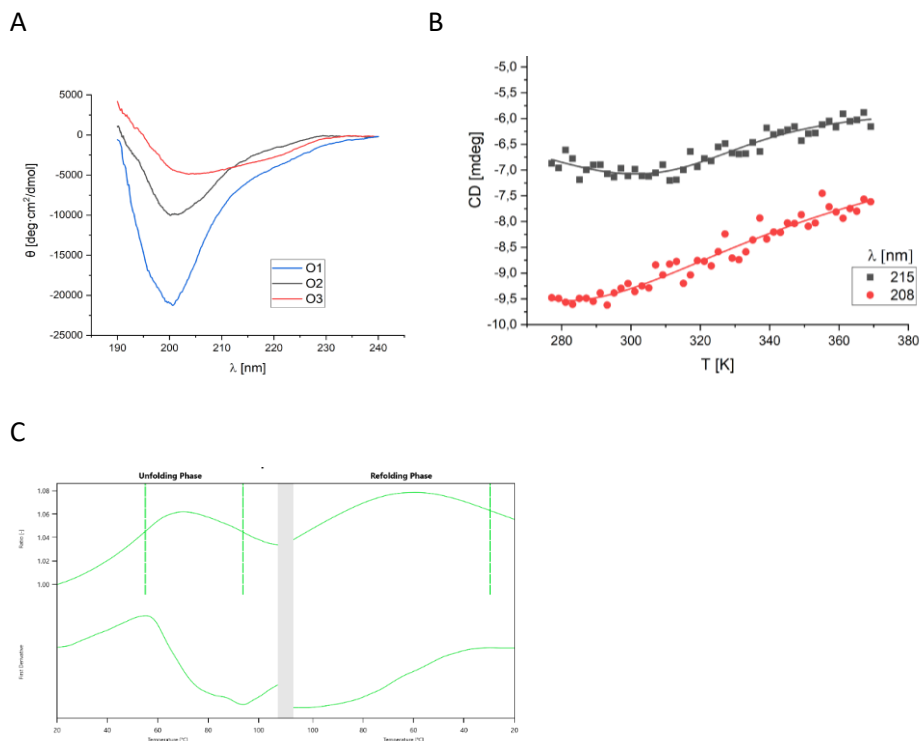
3.3.2 Analiza strukturalna

Analiza strukturalna zsyntetyzowanych minibiałek została przeprowadzona z wykorzystaniem dichroizmu kołowego (CD) i różnicowej fluorymetrii skaningowej (nanoDSF). W pierwszej kolejności zmierzono widma CD w stałej temperaturze 25 °C i zakresie długości fal 195 nm – 240 nm. Na tej podstawie możliwa była identyfikacja obecnych struktur drugorzędowych. Dodatkowo wyznaczono krzywe denaturacji przy

stałych długościach fali (208 nm i 215 nm) i zmiennej temperaturze (4 °C - 96 °C). Badanie miało na celu określenie stabilności temperaturowej białka, a wybrane długości fali odpowiadają kolejno minimum charakterystycznemu dla helisy zawierającej β -aminokwas *trans*-ACPC oraz dla β -kartek. Sigmoidalny kształt krzywych denaturacji temperaturowej umożliwia wyznaczenie temperatury rozwijania minibiałka $T_{M,CD}$. Komplementarną metodą jest pomiar krzywej denaturacji przy użyciu nanoDSF. Mierzony jest stosunek fluorescencji w 350 nm / 330 nm, co pozwala na określenie zmian zachodzących w otoczeniu reszt aromatycznych. Ze względu na częstą obecność tych reszt w obrębie hydrofobowego rdzenia białek, w wielu przypadkach można przyjąć, że punkt przegięcia krzywej denaturacji otrzymanej tą metodą odpowiada temperaturze, w której dochodzi do zmiany konformacyjnej lub całkowitego rozwinięcia się białka ($T_{M,nanoDSF}$).

Widma minibiałek **O1** i **O2** nie wykazały charakterystycznych dla β -kartki minimów w okolicy 215-218 nm (rysunek 55). Ze względu na brak wykrycia oczekiwanych elementów strukturalnych nie poddano ich dalszej analizie strukturalnej. Analog **O3**, do którego zwrotów wprowadzono D-prolinę, wskazuje na obecność bardziej złożonej struktury, a otrzymane widmo CD zawiera dodatkowe minimum rozciągające się od 215 nm do 222 nm. Istnieje możliwość, że w jego skład wchodzi dwie nakładające się krzywe – β -kartka i α -helisa. Krzywe denaturacji temperaturowej w wybranych długościach fali mają zbliżony kształt, jednak ta zmierzona dla 208 nm nie wykazuje wyraźnego punktu przegięcia (rysunek 55).

Wyniki nanoDSF dla minibiałka **O3** porównano z T_M otrzymanymi z dichroizmu kołowego. Maksimum pierwszej pochodnej krzywej denaturacji temperaturowej przypada w temperaturze 55 °C, zbliżonej do wartości z CD obliczonej dla 215 nm ($48,1 \pm 7,3$ °C) (tabela 20). Może to oznaczać, że struktura rozwija się w jednym etapie, a zwijanie się ma charakter kooperacyjny. Brak wyraźnego punktu przegięcia dla długości fali 208 nm wzbudza jednak wątpliwości. Krzywa renaturacji, uzyskana poprzez pomiar nanoDSF w trakcie chłodzenia próbki do temperatury 20 °C, nie powraca do stanu początkowego; minibiałko nie wraca do oryginalnej konformacji w czasie pomiaru.



Rysunek 55. (A) Widma CD minibiałek **O1-O3** wykonane w buforze fosforanowym o pH = 7,5. Wartości na osi y znormalizowano ze względu na liczbę aminokwasów. (B) Krzywe denaturacji temperaturowej minibiałka **O3** dla dwóch wybranych długości fali. (C) Krzywa denaturacji temperaturowej minibiałka **O3** zmierzona przy pomocy techniki nanoDSF.

Tabela 20. Porównanie wartości T_M uzyskanej na podstawie pomiarów CD i nanoDSF dla minibiałka **O3**.

minibiałko	$T_{M,CD\ 208}$ [°C]	$T_{M\ CD\ 215}$ [°C]	$T_{M\ nanoDSF}$ [°C]
O3	~50	48,1 ± 7,3	55

3.3.3 Poprawienie charakterystyki strukturalnej

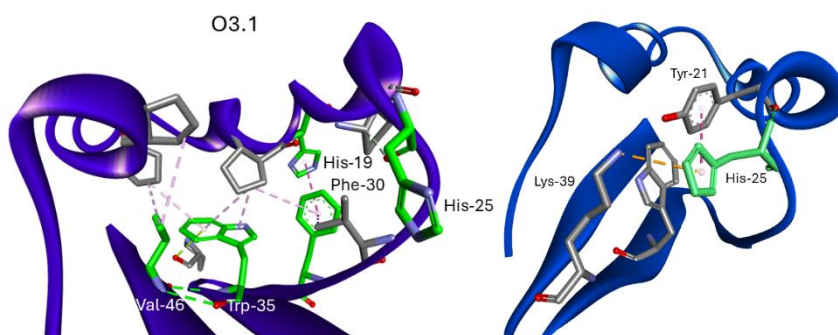
3.3.3.1. Projektowanie

W celu zwiększenia stabilności temperaturowej minibiałka **O3** zaprojektowano serię 6 analogów. Propozycje mutacji wybrano na podstawie analizy modelu strukturalnego z wykorzystaniem programu Discovery Studio. Szczególną uwagę poświęcono wnętrzu hydrofobowemu, dążąc do lepszego upakowania reszt i zwiększenia liczby oddziaływań π - π i π -alkilowych.

Tabela 21. Sekwencje analogów **O3.1-O3.6**. W celu porównania z wyjściową sekwencją zawarto także sekwencję minibiałka **O3**. Kolorem niebieskim zaznaczono reszty aminokwasowe, które uległy zmianie.

minibiałko	sekwencja
O3	KVEYPQ●RKL●EQTPNR●EE Y●QKAGNVTK KpPTYEWTkP PQQYTATQ
O3.1	KVEYPQ●RKL●EQTPNR●HE Y●QKHGNVTF KpPTWEWTkP PQQYTVTQ
O3.2	KVEYPQ●RKL●EQTPNRF●EY●QKAGNVTK KpPTYEWTkP PQQYTATQ
O3.3	KVEYPQ●RKL●EQTPNRF●EY●QKQGNVTK KpPTYEWTkP PQQYTATQ
O3.4	KVEHPQ●RKE●EQTPNRF●EY●QKQGNVTK KpPTYEWTkP PQQYTATQ
O3.5	KVEHPQ●RKK●EQTPNEA●EY●QKQGNVTK KpPTYEWTkP PQQYTATQ
O3.6	KVEHPQ●RKK●EQTPNEA●EY●QKQGNVTV KpPTYEWTkP PQQYTATQ

Sekwencja **O3.1** zawiera największą liczbę modyfikacji, w tym dodatkową resztę tryptofanu (Trp-35). Według modelu powinna ona tworzyć dodatkowe oddziaływania z resztami *trans*-ACPC, stabilizując pożądaną konformację (rysunek 56). Mostek solny zamieniono na oddziaływanie π - π poprzez współgrające ze sobą mutacje E19H i K30F, a resztę Ala-46 zastąpiono waliną, co pozwoliło na lepsze wypełnienie przestrzeni wewnątrz rdzenia minibiałka. Z kolei mutacja A25H wprowadza możliwość tworzenia oddziaływań π - π z pobliską tyrozyną i tryptofanem lub oddziaływania typu π -kation z Lys-39.

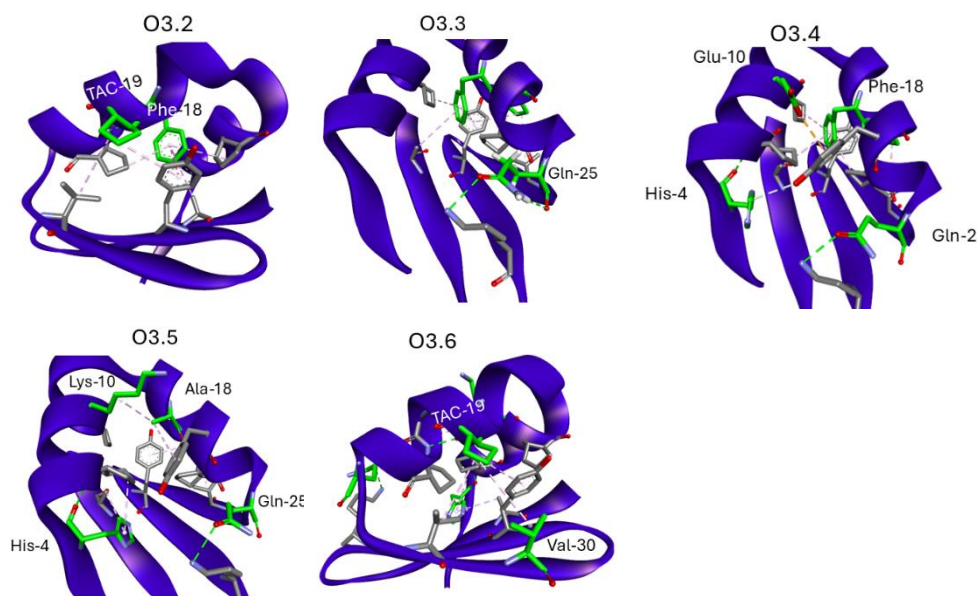


Rysunek 56. Wymodelowane minibiałko **O3.1**. Reszty aminokwasowe biorące udział w nowo powstałych oddziaływaniach zostały przedstawione w reprezentacji patyczkowej, a kolorem zielonym zaznaczono wprowadzone mutacje.

W analogach **O3.2-O3.6** przesunięto pozycję *trans*-ACPC o jedno miejsce, tak aby uwolnić kluczowe miejsce zwrócone ku wnętrzu dla reszty o większym łańcuchu bocznym (**O3.2-O3.4**) lub alaniny, której niewielki rozmiar mógłby sprzyjać powstaniu wnetki (**O3.5-O3.6**). W przypadku minibiałka **O3.6** w pozycji 30 umieszczono resztę waliny, której mniejszy rozmiar może promować poprawne umiejscowienie helis nad β -kartką. Dodatkową stabilizację zapewniają oddziaływanie hydrofobowe z umieszczonym nad nią pierścieniem *trans*-ACPC (rysunek 57).

Mutacja A25Q, obecna w sekwencjach **O3.3-O3.6**, umożliwia utworzenie sieci wiązań wodorowych z Lys-38 i Tyr-21. W wariantach **O3.4-O3.6** dodatkowo zamieniono Tyr-4 na resztę histydyny, której mniejszy rozmiar lepiej wpasowuje się w otoczenie, nie zaburzając oddziaływań π - π i π -alkilowych.

Reszta Leu-10 jest wyeksponowana do rozpuszczalnika, dlatego w wariantach **O3.4-O3.6** zamieniono ją hydrofilowymi aminokwasami. Obdarzone ładunkiem grupy boczne mogą oddziaływać z innymi na powierzchni minibiałka, takimi jak Arg-17 czy Glu-12, lub resztami aromatycznymi.



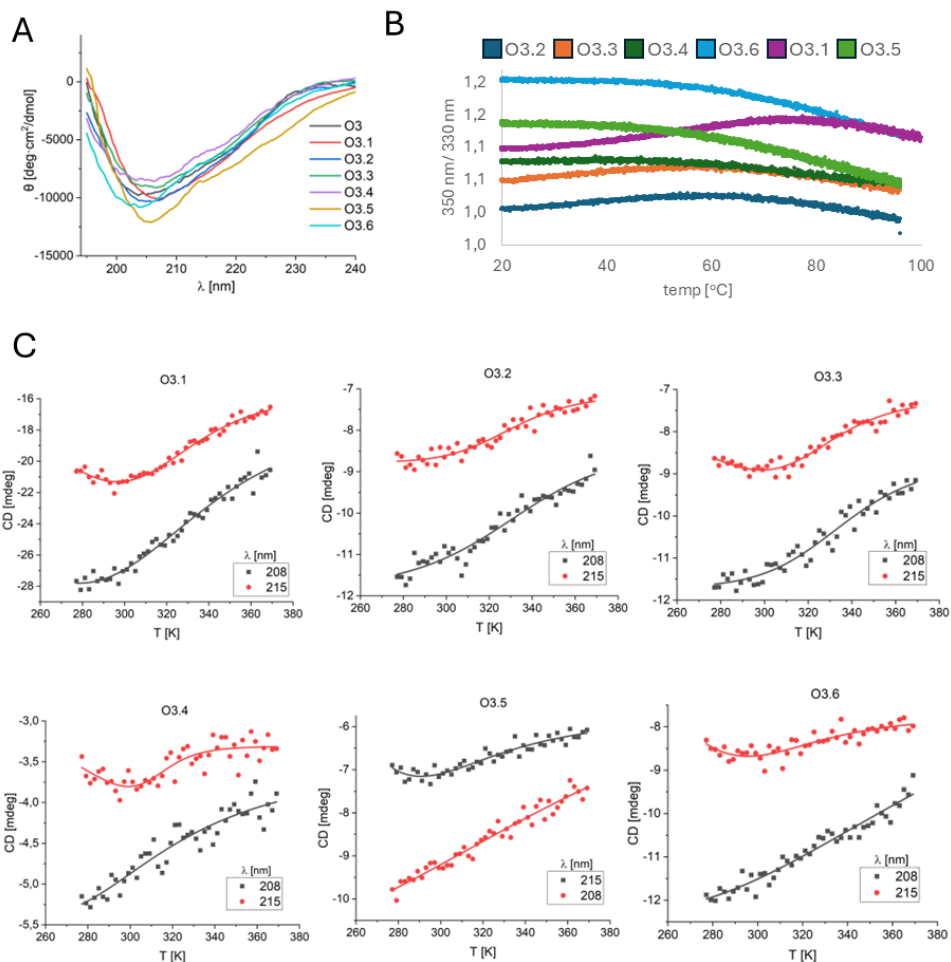
Rysunek 57. Wymodelowane analogi minibiałka **O3**. Reszty aminokwasowe biorące udział w nowo powstałych oddziaływaniach zostały przedstawione w reprezentacji patyczkowej, a kolorem zielonym zaznaczono wprowadzone mutacje.

3.3.3.2. Analiza strukturalna

Analizie strukturalnej poddano sześć związków, a zarejestrowane widma dichroizmu kołowego wykazały obecność złożonych struktur drugorzędowych u wszystkich analogów (rysunek 58). Na widmach peptydów **O3.4**, **O3.5** i **O3.6** można zaobserwować rozdzielenie się poprzednio nakładających się minimów. Ze względu na przesunięcie drugiego sygnału w okolice 222 nm, najprawdopodobniej zawierają one większą liczbę fragmentów α -helikalnych kosztem części β -kardki. W przypadku minibiałka **O3.6** mogło dojść do częściowego rozwinięcia się struktury, ponieważ minimum eliptyczności molarnej przesunęło się w kierunku krótszych długości fali, co jest charakterystyczne dla zwiększenia się udziału struktur nieuporządkowanych.

Krzywe temperaturowe otrzymane metodą CD wskazują na równoczesne rozwijanie się obydwu monitorowanych elementów struktury drugorzędowej minibiałek **O3.1-O3.3** w temperaturze ok. 50-60 °C. W przypadku pozostałych analogów wyniki otrzymane dla $\lambda = 208$ nm mają przebieg liniowy. Świadczy to o spadku stabilności fragmentów helikalnych, których proces rozwijania się zaczyna się już od początku eksperymentu. Wspólną cechą sekwencji **O3.4-O3.6** jest mutacja w pozycji 10, która znajduje się w obrębie helisy. Najprawdopodobniej obecność hydrofobowej reszty Leu w tej pozycji ma istotny wpływ stabilizujący.

Porównanie wyników z danymi uzyskanymi metodą nanoDSF wykazało, że jedynie analog **O3.1** charakteryzuje się sigmoidalnym przebiegiem z wyraźnym punktem przegięcia. Wyznaczona temperatura denaturacji $T_{M,nanoDSF}$ równa 54 °C niemal idealnie pokrywa się z wartością otrzymaną metodą CD (tabela 22). Zgodność ta świadczy o tym, że rozwijanie się elementów struktury drugorzędowej jest równoczesne z ekspozycją reszt aromatycznych dla rozpuszczalnika. W przypadku pozostałych wariantów współczynnik fluorescencji zmniejsza się wraz z temperaturą, co może być wynikiem agregacji i zmniejsza wiarygodność uzyskanych wartości $T_{M,nanoDSF}$.



Rysunek 58. (A) Widma CD minibiałek **O3.1-O3.6** wykonane w buforze fosforanowym o pH = 7,4. (B) Krzywe denaturacji temperaturowej minibiałek **O3.1-O3.6** zmierzone przy pomocy techniki nanoDSF. (C) Krzywe denaturacji temperaturowej minibiałek **O3.1-O3.6** dla dwóch wybranych długości fali.

Tabela 22. Porównanie wartości temperatur denaturacji temperaturowej minibiałek wyznaczonej przy użyciu dwóch metod.

Minibiałko	$T_{M,CD\ 208}$ [°C]	$T_{M,CD\ 215}$ [°C]	$T_{M,nanoDSF}$ [°C]
O3.1**	~50	52 ± 4,1	54
O3.2**	~50	55 ± 4,9	agregacja
O3.3**	~50	~50	agregacja
O3.4**	brak	37 ± 7,3	agregacja
O3.5**	brak	~45	agregacja
O3.6**	brak	~45	agregacja

** - peptydy zsyntetyzowane, oczyszczone i scharakteryzowane przez Dr. Manisha Kumara z Katedry Chemii Bioorganicznej, Politechnika Wrocławska

3.3.4. Druga iteracja optymalizacji

3.3.4.1. Projektowanie

Minibiałko **O3.1** zdecydowano się poddać kolejnej iteracji doboru stabilizujących mutacji, które wybrano na dwa sposoby. Pierwszy zestaw sekwencji przygotowano poprzez propozycje zmian modelowanych w Discovery Studio. Celowano w dwa punkty: nieć β -kartki na C-końcu, która mogłaby przyczynić się do lepszego wypełnienia przestrzeni we wnętrzu minibiałka (**O3.1.2**, **O3.1.3**, **O3.1.4**, **O3.1.5**, **O3.1.6**, **O3.1.7**) oraz fragment helisy tuż przy jej zwrocie, który mógłby być stabilizowany przez mostek solny (**O3.1.1**, **O3.1.5**, **O3.1.6**).

Mutacje w pozycji 10 stanowiły kolejną próbę wzmocnienia oddziaływań między helisami. Poprzednie podstawienia w analogach **O3.4-O3.6** (Lys i Glu) nie przyniosły oczekiwanych rezultatów. Biorąc pod uwagę, że mutacje mogą mieć charakter kooperacyjny i zależny od kontekstu całej sekwencji, zdecydowano się ponownie przetestować możliwość wprowadzenia mostka solnego pomiędzy helisami.

W analogu **O3.1.1** resztę leucyny zastąpiono glutaminianem, który powinien oddziaływać z Arg-17, a w sekwencjach **O3.1.5-O3.1.6** asparaninianem. Z kolei w minibiałku **O3.1.4** zastosowano mutację L10A. Niewielki rozmiar tej reszty powinien ograniczyć niekorzystną ekspozycję hydrofobowej reszty na rozpuszczalnik.

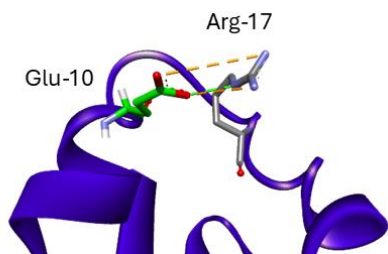
Kolejny cel do wprowadzania mutacji stanowił C-końcowy fragment sekwencji. Znajdujący się w minibiałku **O3.1** fragment -Val-Thr-Gln- nie wypełnia całkowicie przestrzeni pomiędzy helisami a β -kartką. W analogach **O3.1.2**, **O3.1.6** i **O3.1.7** resztę Val-46 zastąpiono izoleucyną, a do sekwencji **O3.1.3**, **O3.1.4** i **O3.1.5** wprowadzono mutacje V46M i Q48I. Mutacja T47E w sekwencji **O3.1.2** wprowadza dodatkowy mostek solny z Arg-8, a więc pomiędzy β -kartką a helisą (rysunek 59).

Drugi sposób optymalizacji obejmował zupełne przeprojektowanie sekwencji z wykorzystaniem protokołu Rosetta FastDesign. Sekwencje zostały także skrócone o jedną resztę aminokwasową (**O3.1.9-O3.1.11**) lub dwie (**O3.1.8**). Zmianie uległa znaczna część sekwencji.

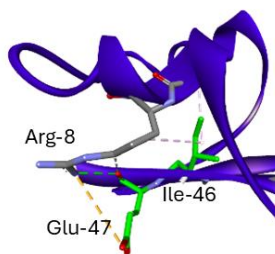
Tabela 23. Sekwencje analogów **O3.1.1-O3.1.11**. W celu porównania z wyjściową sekwencją zawarto także sekwencję minibiłka **O3.1**. Kolorem zielonym zaznaczono reszty aminokwasowe, które uległy zmianie.

minibiłka	sekwencja
O3.1	KVEYPQ●RKLEQT PNR●HEY●QKHGNTFKpPTWEWTKpPQQYTVTQ
O3.1.1	KVEYPQ●RKE●EQTPNR●HEY●QKHGNTFKpPTWEWTKpPQQYTVTQ
O3.1.2	KVEYPQ●RKLEQT PNR●HEY●QKHGNTFKpPTWEWTKpPQQYTIEQ
O3.1.3	KVEYPQ●RKLEQT PNR●HEY●QKHGNTFKpPTWEWTKpPQQYTM TI
O3.1.4	KVEYPQ●RKA●EQTPNR●HEY●QKHGNTFKpPTWEWTKpPQQYTM TI
O3.1.5	KVEYPQ●RKDEQT PNR●HEY●QKHGNTFKpPTWEWTKpPQQYTM TI
O3.1.6	KVEYPQ●RKDEQT PNR●HEY●QKHGNTFKpPTWEWTKpPQQYTIT I
O3.1.7	KVEYPQ●RKLEQT PNR●HEF●QKHGNTFKpPTWEWTKpPQQYTITQ
O3.1.8	KQPE●EKL●KEDPRK●YEY●EKVGEYEEHpPTIKWRKpPVEYEVKY
O3.1.9	KRHPY●EEL●KKDPAK●IEY●KKLGPEYIRpPEIVWHDpPTRYELRY
O3.1.10	KRQPY●EKL●KEDPRK●YEY●EHVGEYELHpPTLKW RKpPHEYELKL
O3.1.11	KRQPY●EKL●KEDPRK●YEY●RHVGEYELHpPTLKW RKpPVEYELQF

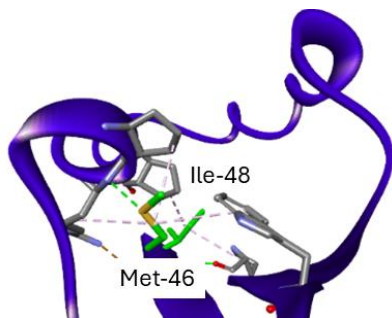
mostek solny – **O3.1.1**



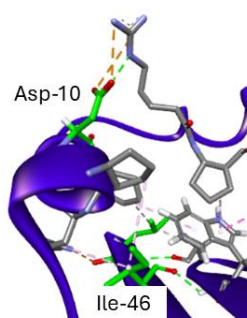
C-końcowy fragment – **O3.1.2**



C-końcowy fragment – **O3.1.3**

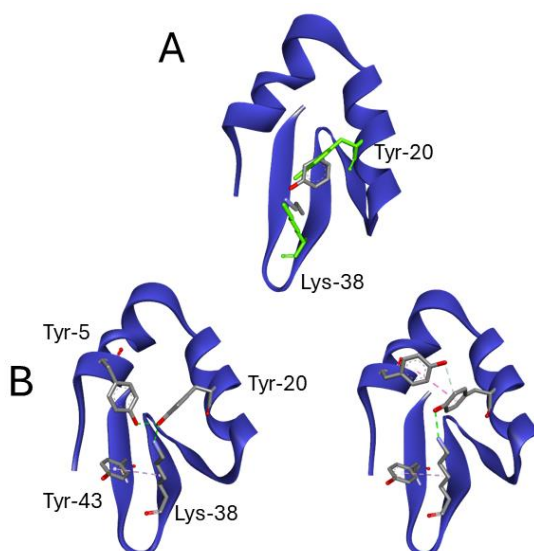


kombinacja mutacji – **O3.1.6**



Rysunek 59. Wymodelowane analogi minibiłka **O3.1**. Reszty aminokwasowe biorące udział w nowo powstałych oddziaływaniach zostały przedstawione w reprezentacji patyczkowej, a kolorem zielonym zaznaczono wprowadzone mutacje.

Ze względu na docelowe wykorzystanie projektowanych minibiałek jako katalizatorów reakcji aldolowej, zwrócono uwagę na odpowiednie odwzorowanie miejsca aktywnego. Nałożenie katalitycznych reszt struktury krystalicznej retroaldolazy **RA95.5.8F** na uzyskane modele pozwoliło określić, czy położenie oraz odległości między grupami funkcjonalnymi tych aminokwasów są podobne. Tworząca się sieć oddziaływań pomiędzy lizyną a dwiema tyrozynami jest zależna od orientacji łańcuchów bocznych reszt Tyr-5 i Tyr-43, które mogą, ale nie muszą, oddziaływać z katalityczną lizyną oraz resztą Tyr-20 (rysunek 60).



Rysunek 60. (A) Nałożenie reszt katalitycznych ze struktury krystalicznej retroaldolazy **RA95.5.8F** (szare) na odpowiadające im reszty w obrębie miejsca aktywnego **O3.1.10** (zielone). (B) Alternatywne sieci oddziaływań wewnątrz minibiałka **O3.1.10** w zależności od ułożenia łańcuchów bocznych Tyr-5 i Tyr-43.

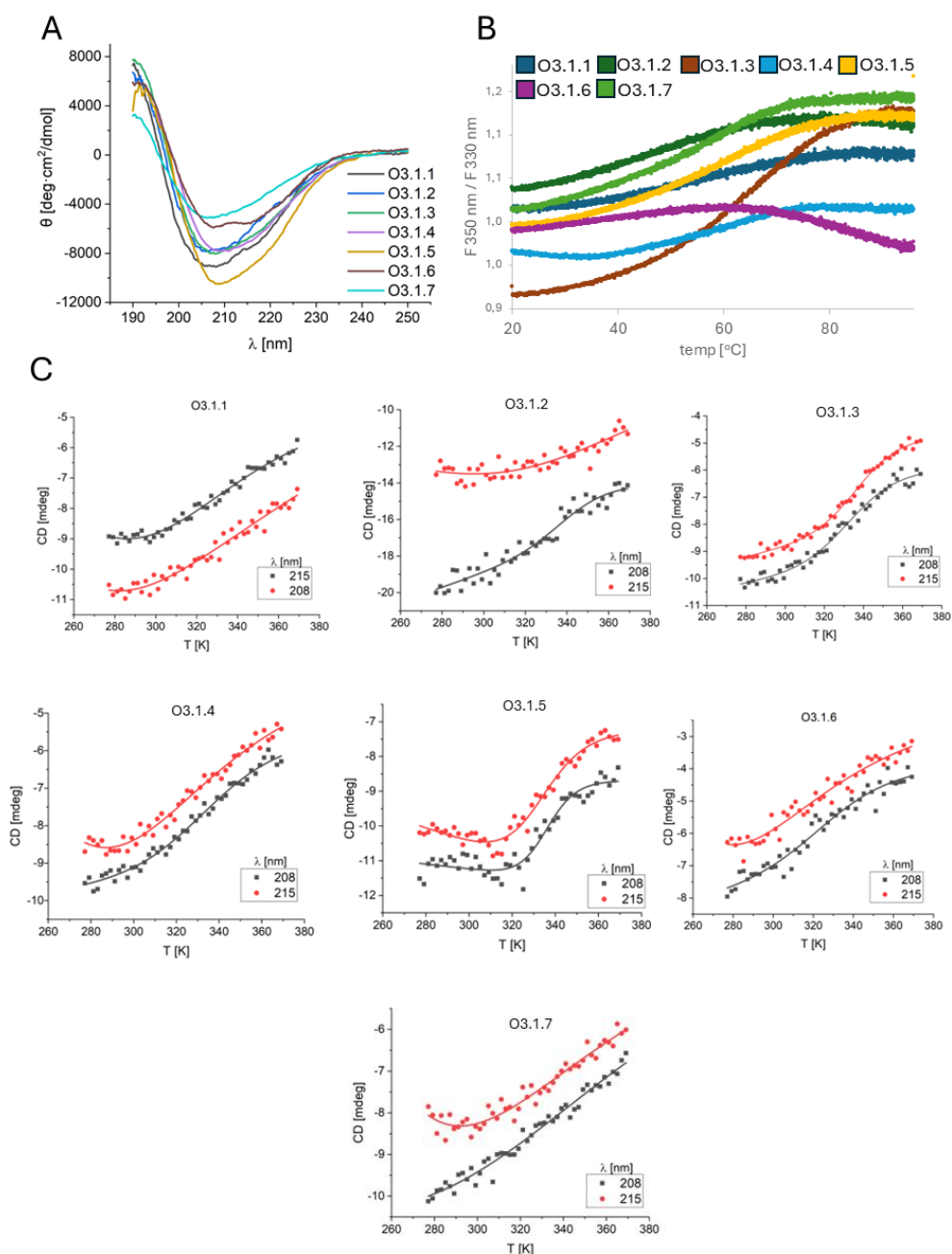
3.3.4.2. Analiza strukturalna

Analizę strukturalną wykonano dla wszystkich 12 związków, wykorzystując metody CD i nanoDSF. Dla minibiałek otrzymano temperatury denaturacji w przedziale od ok. 40 do 70 °C (rysunek 61, tabela 24).

Widma CD otrzymane dla analogów **O3.1.1**, **O3.1.3**, **O3.1.4**, **O3.1.5** i **O3.1.7** mają spodziewany kształt, charakteryzujący się obecnością dwóch nakładających się sygnałów (ok. 208 nm i ok. 215 nm). Wyjątkowy przebieg wykazuje widmo **O3.1.6**,

o wyraźnie oddzielonych od siebie minimach 208 nm i 222 nm, co może wskazywać na większą obecność helis kosztem β -kardki. Przybliżone wartości $T_{M,CD}$ dla otrzymanych minibiałek wskazuje na zgodność z wynikami uzyskanymi metodą nanoDSF.

W przypadku wariantów przeprojektowanych całkowicie, analiza strukturalna oparta na widmach dichroizmu kołowego wskazuje na wysoką stabilność temperaturową badanych analogów – bliską 70 °C i obecność uporządkowanej struktury drugorzędowej. Krzywe denaturacji minibiałek **O3.1.8**, **O3.1.10** i **O3.1.11** są charakterystyczne dla kooperatywnego procesu zwijania się białek, jednak nie obserwuje się całkowitego rozwinięcia (rysunek 62). Wartość temperatury denaturacji, oszacowana na podstawie momentu rozpoczęcia procesu i zakończenia pomiaru (96 °C), jest zgodna z $T_{M,nanoDSF}$. Na tym etapie przyjęto więc, że otrzymane minibiałka zwijają się w uporządkowane konformacje, a poszczególne elementy oddziałują ze sobą w sposób stabilizujący strukturę trzeciorzędową.

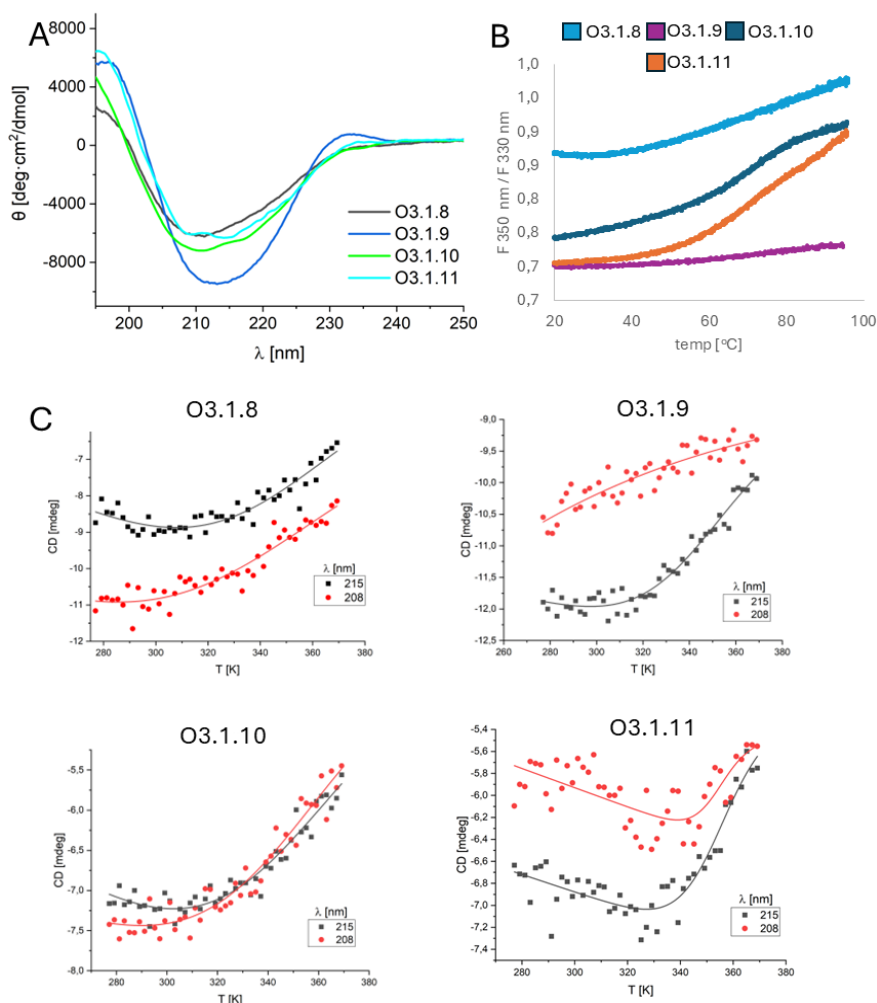


Rysunek 61. (A) Widma CD minibiałek **O3.1.1-O3.1.7** wykonane w buforze fosforanowym o pH = 7,4. (B) Krzywe denaturacji temperaturowej minibiałek **O3.1.1-O3.1.7** zmierzone przy pomocy techniki nanoDSF. (C) Krzywe denaturacji temperaturowej minibiałek **O3.1.1-O3.1.7** dla dwóch wybranych długości fali.

Tabela 24. Porównanie wartości temperatur denaturacji temperaturowej minibiałek wyznaczonej przy użyciu dwóch metod.

Minibiałko	$T_{M,CD\ 208}$ [°C]	$T_{M,CD\ 215}$ [°C]	$T_{M,nanoDSF}$ [°C]
03.1.1**	~50	~50	52
03.1.2	>50	52,2 ± 10,2	46
03.1.3	63,1 ± 3,6	66,6 ± 1,7	60
03.1.4	66,3 ± 6,6	~60	62
03.1.5	62,7 ± 1,8	60,4 ± 1,7	62
03.1.6	~45	~45	agregacja
03.1.7	brak	>50	52

** - peptydy zsyntetyzowane i oczyszczone przez Dr. Manisha Kumara z Katedry Chemii Bioorganicznej, Politechnika Wrocławska



Rysunek 62. (A) Widma CD minibiłek O3.1.8-O3.1.11 wykonane w buforze fosforanowym o pH = 7,4. (B) Krzywe denaturacji temperaturowej minibiłek zmierzone przy pomocy techniki nanoDSF. (C) Krzywe denaturacji temperaturowej minibiłek dla dwóch wybranych długości fali.

Tabela 25. Porównanie wartości temperatur denaturacji temperaturowej minibiłek wyznaczonej przy użyciu dwóch metod.

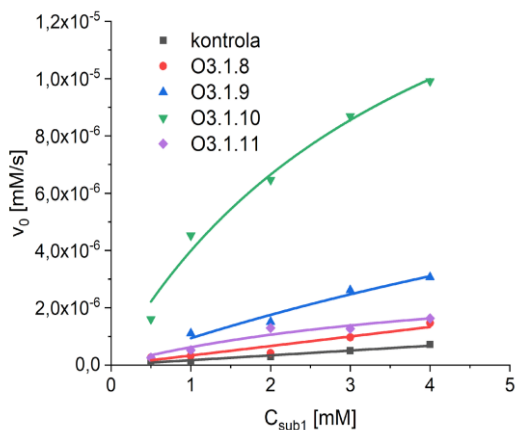
Minibiłko	$T_{M,CD\ 208}$ [°C]	$T_{M,CD\ 215}$ [°C]	$T_{M,nanoDSF}$ [°C]
O3.1.8	$56,9 \pm 5,4$	>50	60
O3.1.9	brak	$79,8 \pm 9,4$	72
O3.1.10	>70	>70	72
O3.1.11	>70	$82,3 \pm 4,5$	73

3.3.4.3. Aktywność katalityczna

Cztery minibiałka (**O3.1.8**, **O3.1.9**, **O3.1.10**, **O3.1.11**) o najlepszej charakterystyce strukturalnej poddano analizie pod kątem aldolazowej aktywności katalitycznej. Badania aktywności katalitycznej oparto o pomiar szybkości reakcji w 50 mM buforze fosforanowym o $\text{pH} = 7,4$ po 1 godzinie dla mieszanin reakcyjnych o różnym stężeniu fenyloacetaldehydu (0,5 mM-4 mM). Stężenia 4-nitrobenzaldehydu i minibiałka były stałe, odpowiednio 2 mM i 0,1 mM. Próbkę rozcieńczono dwukrotnie acetonitrylem przed pomiarem. Parametry katalizy enzymatycznej obliczono przy użyciu oprogramowania OriginPro, wykorzystując funkcję dopasowującą dane do krzywej Michaelisa-Menten. Kontrolę stanowił pomiar bez dodatku minibiałka.

Wszystkie zmierzone związki wykazały aktywność katalityczną, a dwa z nich dopasowano do modelu Michaelisa-Menten (**O3.1.10** i **O3.1.11**). Pozostałe krzywe miały przebieg liniowy, dla których niemożliwe było wyznaczenie parametrów katalitycznych (rysunek 63). Do porównania rozpiętości wyników posłużono się więc prędkością początkową reakcji v_0 w jednym punkcie (dla 3 mM stężenia fenyloacetaldehydu). Wyniki mieszczą się w zakresie od wartości $1,0 \cdot 10^{-6} \text{ mM} \cdot \text{s}^{-1}$ dla **O3.1.11** do $8,0 \cdot 10^{-6} \text{ mM} \cdot \text{s}^{-1}$ dla najaktywniejszego minibiałka, **O3.1.10** (tabela 26).

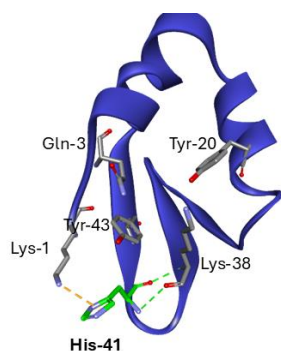
Wariant ten wyraźnie wyróżnia się szybkością reakcji, osiągając ok. 3000-krotne przyspieszenie względem reakcji niekatalizowanej. Istotnym ograniczeniem jest jednak pozorna wartość parametru $K_M > 4 \text{ mM}$, sugerująca niską specyficzność enzymatyczną. Co ciekawe, najistotniejszą różnicą między wariantami **O3.1.10** i **O3.1.11** - mutantem o znacznie obniżonej aktywności — jest substytucja H41V (rysunek 64). Zakładając, że obydwa minibiałka przyjmują tę samą konformację przestrzenną, różnica ta sugeruje, że reszta ta znajduje się w sąsiedztwie miejsca aktywnego. Może ona zatem uczestniczyć w katalizie poprzez tworzenie oddziaływań z innymi resztami aminokwasowymi w jego obrębie lub poprzez zmianę lokalnego rozkładu ładunków. Alternatywnie, oddziaływanie z tą resztą może wpływać na położenie N-końca minibiałka, a w rezultacie na zamknięcie dostępu do miejsca katalitycznego dla substratów.



Rysunek 63. Wykresy Michaelisa-Menten dla minibiłek **O3.1.8-O3.1.11** przy stałym stężeniu 4- nitrobenzaldehydu i rosnącym stężeniu fenyloacetaldehydu. Krzywe łączące punkty odpowiadają dopasowaniu do modelu Michaelisa-Menten, na podstawie którego wyznaczono parametry katalityczne.

Tabela 26. Parametry katalityczne minibiłek obliczone na podstawie dopasowania do modelu Michaelisa-Menten.

Minibiątko	k_{cat}/k_{uncat}	K_M [mM]	$k_{cat}/K_M \cdot 10^5$ [s ⁻¹ ·mM ⁻¹]	$v_0 \cdot 10^6$ [mM·s ⁻¹] dla $C_{sub1} = 3$ mM
O3.1.8	złe dopasowanie			1,5
O3.1.9	złe dopasowanie			2,1
O3.1.10	2765 ± 291	4,4 ± 1,9	4,8 ± 2,1	8,6
O3.1.11	462 ± 141	4,6 ± 3,5	0,8 ± 0,6	1,0



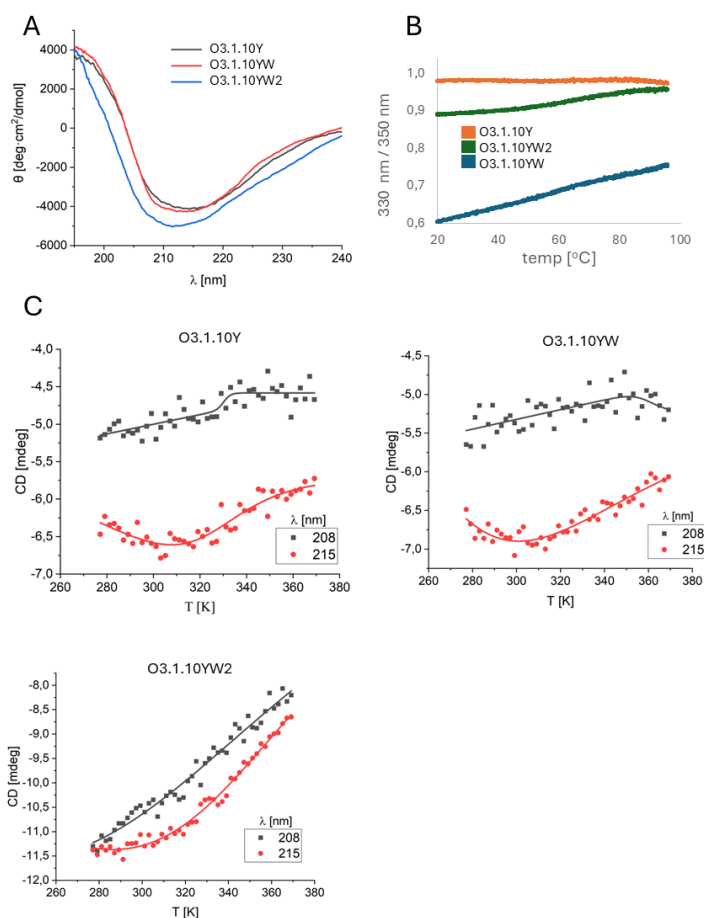
Rysunek 64. Wymodelowane minibiątko **O3.1.10** z zaznaczoną na zielono pozycją 41 i pokazanymi resztami aminokwasowymi, na które może wpływać.

3.3.5.2. Analiza strukturalna

Porównanie przebiegu widm CD minibiałek **O3.1.10Y** i **3.1.10YW** względem związku wyjściowego nie wskazuje na żadne zmiany w obrębie struktury drugorzędowej (rysunek 66). Ze względu na brak tryptofanu w sekwencji, krzywa denaturacji temperaturowej **O3.1.10Y** otrzymana metodą nanoDSF nie jest wiarygodna. Natomiast w przypadku **O3.1.10YW** odbiega ona kształtem od oczekiwanego, a wartości stosunku fluorescencji 350 nm / 330 nm utrzymują się na poziomie powyżej 0,9. Może to oznaczać, że wprowadzony do tej struktury Trp-47 jest wyeksponowany do rozpuszczalnika nawet w niskich temperaturach. Stabilność temperaturowa zmierzona dla wybranych długości fali wskazuje na brak zmian dla $\lambda = 208$ nm oraz $T_{M,CD\ 215}$ ok. 50 °C (**O3.1.10Y**) lub wyższą (**O3.1.10YW**).

Na widmie CD minibiałka **O3.1.10YW2** zaobserwowano obecność nowego minimum odpowiadającego długości fali 230 nm, które pojawia się w białkach ze znaczną ilością oddziaływań między resztami aromatycznymi. Zgodnie z modelem przeniesienie tryptofanu na pozycję 45 skutkuje powstaniem większej liczby oddziaływań wewnątrz rdzenia hydrofobowego, szczególnie ze znajdującymi się w pobliżu tyrozynami. Zarówno krzywe denaturacji otrzymane drogą CD, jak i nanoDSF tworzą spójny obraz, według którego minibiałko rozwija się w temperaturze ok. 60 °C.

Wszystkie trzy warianty poddano pomiarom NMR. Zmierzono ^1H NMR i 2D NMR w buforze fosforanowym o pH = 7,4. Niestety, widma nie nadawały się do rozwiązania ze względu na nakładające się sygnały i obecność dodatkowych konformacji.



Rysunek 66. (A) Widma CD minibiałek **O3.1.10Y**, **O3.1.10YW**, **O3.1.10YW2** wykonane w buforze fosforanowym o pH = 7,4. (B) Krzywe denaturacji temperaturowej minibiałek zmierzone przy pomocy techniki nanoDSF. (C) Krzywe denaturacji temperaturowej minibiałek dla dwóch wybranych długości fali.

Tabela 28. Porównanie wartości temperatur denaturacji temperaturowej minibiałek wyznaczonej przy użyciu dwóch metod.

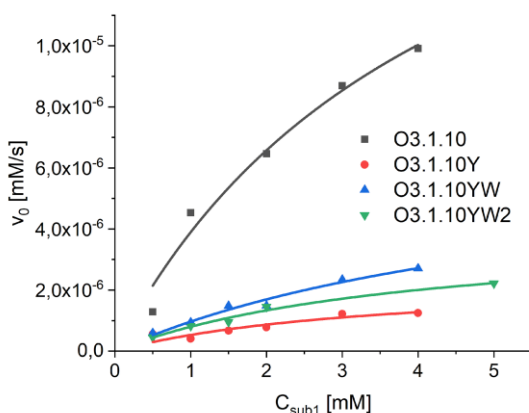
Minibiałko	$T_{M,CD\ 208}$ [°C]	$T_{M,CD\ 215}$ [°C]	$T_{M,nanoDSF}$ [°C]
O3.1.10Y**	Brak zmian	~50	Brak Trp
O3.1.10YW**	Brak zmian	> 50	Brak zmian
O3.1.10YW2**	$57,3 \pm 3,1$	$54,7 \pm 5,2$	66

** - peptydy zsyntetyzowane i oczyszczone przez Dr. Manisha Kumara z Katedry Chemii Bioorganicznej, Politechnika Wrocławska

3.3.5.3. Aktywność katalityczna

Minibiałka zawierające mutację W36Y poddano testom aktywności katalitycznej, otrzymując przyspieszenia reakcji od 300-krotnego w przypadku **O3.1.10Y** do 1000-krotnego dla **O3.1.10YW2**. Dane dopasowano do modelu Michaelisa-Menten, jednak obliczone wartości K_M były obarczone znacznym błędem. Wynika to z braku pełnego wypłaszczenia krzywych (rysunek 67).

W porównaniu z **O3.1.10**, przejawiana aktywność katalityczna znacznie spadła. Przyczynę mogą stanowić zmiany strukturalne lub zmiany geometrii miejsca aktywnego, w którego centrum znajduje się reszta 36. Mutacja mogła skutkować zmianą rozmiaru lub charakteru chemicznego wnęki wiążącej substrat lub naruszeniem sieci oddziaływań między resztami katalitycznymi.



Rysunek 67. Wykresy Michaelisa-Menten przy stałym stężeniu 4-nitrobenzaldehydu i rosnącym stężeniu fenyloacetaldehydu. Krzywe łączące punkty odpowiadają dopasowaniu do modelu Michaelisa-Menten, na podstawie którego wyznaczono parametry katalityczne.

Tabela 29. Parametry katalityczne minibiałek obliczone na podstawie dopasowania do modelu Michaelisa-Menten.

Minibiałko	k_{cat}/k_{uncat}	K_M [mM]	$k_{cat}/K_M \cdot 10^5$ [s ⁻¹ ·mM ⁻¹]	$v_0 \cdot 10^6$ [mM·s ⁻¹] dla $C_{sub1} = 3$ mM
O3.1.10Y	315 ± 80	3,5 ± 2,5	0,7 ± 0,5	1,1
O3.1.10YW	896 ± 80	6,1 ± 2,2	1,1 ± 0,4	2,0
O3.1.10YW2	1040 ± 315	9,0 ± 5,5	0,9 ± 0,5	1,5

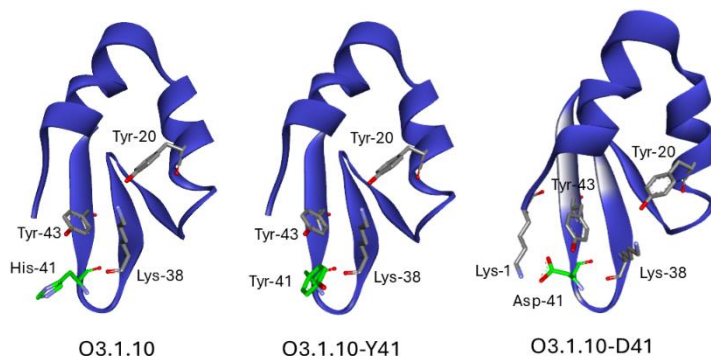
3.3.6. Dobór reszty w pozycji 41

3.3.6.1. Projektowanie

Położenie w bliskim sąsiedztwie centrum aktywnego pozycji 41 sprawia, że stanowi ona interesujący punkt mutacji. W wyjściowym minibiałku **O3.1.10** w pozycji tej występuje histydyna. Reszta ta charakteryzuje się szeregiem pożądanych właściwości: jej dodatni ładunek może obniżać pK_a katalitycznej lizyny, ponadto posiada zdolność do pełnienia funkcji akceptora i donora protonów w mechanizmie katalizy. Mimo tych zalet kształt kieszeni wiążącej oraz odpowiednia konformacja N-końca w dużej mierze decydują o powinowactwie do substratów. Z tego względu eksperymentalne zbadanie innych mutacji w tej pozycji jest wysoce uzasadnione.

W celu zbadania wpływu mutacji w pozycji 41 na przebieg katalizy zaprojektowano dwa nowe analogi (tabela 30). W wariantcie **O3.1.10-Y41** histydynę zastąpiono tyrozyną (rysunek 68). Aminokwas ten wykazuje podobną charakterystykę; może wiązać substrat poprzez oddziaływania π - π , a także brać udział w tworzeniu wiązań wodorowych i transporcie elektronów.

Zupełnie inną strategię przyjęto w przypadku minibiałka **O3.1.10-D41**, w którym skupiono się na oddziaływaniu reszty Asp z N-końcową lizyną (rysunek 68). Według modelu łańcuch boczny asparaginianu jest zbyt krótki, żeby utworzyć mostek solny z katalityczną Lys-38, dlatego reszta ta nie powinna dezaktywować miejsca aktywnego.



Rysunek 68. Modele analogów **O3.1.10**, **O3.1.10-Y41** i **O3.1.10-D41**. Na zielono zaznaczono atomy węgla reszt aminokwasowych poddanych mutacjom. Reprezentacją patyczkową przedstawiono także reszty katalityczne.

Tabela 30. Sekwencje analogów **O3.1.10-Y41** i **O3.1.10-D41**. W celu porównania z wyjściową sekwencją zawarto także sekwencję minibiałka **O3.1.10**. Kolorem zielonym zaznaczono reszty aminokwasowe, które uległy zmianie.

minibiałko	sekwencja
O3.1.10	KRQPY●EKL ●KEDPRK●YE Y●EHVGEYEL HpPTLKWRKp PHEYELKL
O3.1.10-Y41	KRQPY●EKL ●KEDPRK●YE Y●EHVGEYEL HpPTLKWRKp PYEYELKL
O3.1.10-D41	KRQPY●EKL ●KEDPRK●YE Y●EHVGEYEL HpPTLKWRKp PDEYELKL

3.3.6.2. Analiza strukturalna

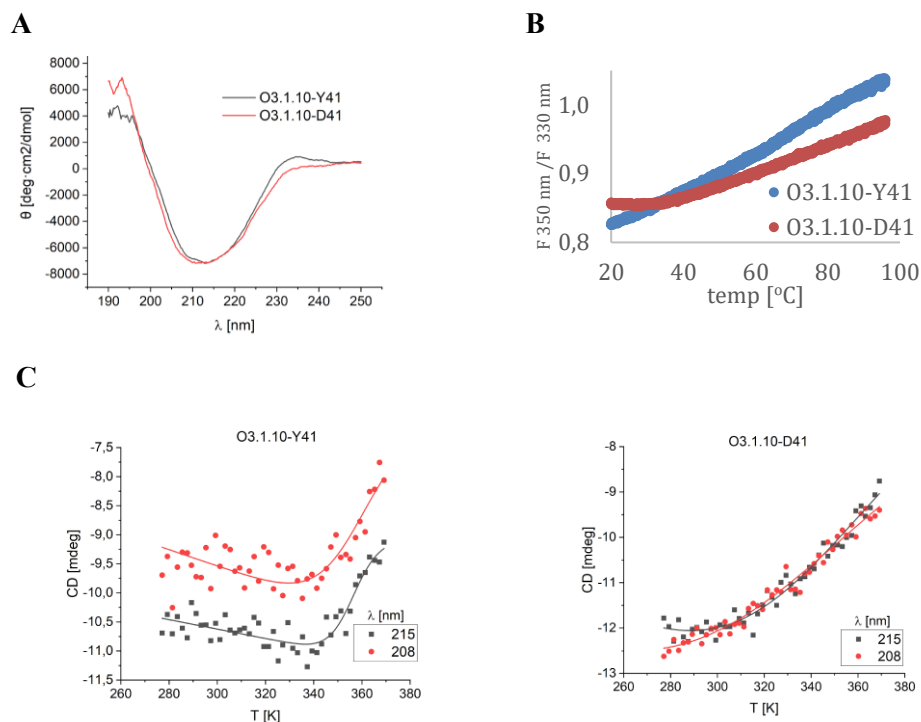
Aby scharakteryzować wpływ wprowadzonych mutacji na właściwości strukturalne i termodynamiczne minibiałek **O3.1.10-Y41** i **O3.1.10-D41** zarejestrowano widma CD, a krzywe denaturacji zmierzono przy użyciu spektroskopii CD oraz nanoDSF. Obie cząsteczki nie wykazują różnic w zawartości elementów struktury drugorzędowej; ich widma CD pokrywają się niemal całkowicie i nie odbiegają przebiegiem od struktury wyjściowej, **O3.1.10** (rysunek 69).

Badane minibiałka charakteryzują się jednak różną stabilnością temperaturową. Krzywe denaturacji wyznaczone metodą CD wskazują na spadek stabilności fragmentów helikalnych i β -kartki w minibiałku **O3.1.10-D41**. Jest to efekt przeciwny do zamierzonego, ponieważ zakładano, że wprowadzona reszta Asp utworzy stabilizujące oddziaływanie z Lys-1. Warto zaznaczyć, że w badanym zakresie temperatur (4-96 °C) nie dochodzi do całkowitego rozwinięcia łańcucha. Przybliżona wartość T_M wynosi około 50 °C, co jest spójne z wynikami otrzymanymi z nanoDSF.

W przypadku minibiałka **O3.1.10-Y41** zaobserwowano wzrost stabilności temperaturowej struktury drugorzędowej, a krzywe zmierzone metodą CD dla dwóch długości fali, 215 nm i 208 nm, wskazują na rozpoczęcie procesu denaturacji dopiero w temperaturze ok. 55 °C. Ta stosunkowo wysoka stabilność jest jednak kontrastowana przez wyniki nanoDSF, gdzie rozwijanie rozpoczyna się razem ze startem eksperymentu (temp. 20 °C).

Dane eksperymentalne sugerują, że wariant **O3.1.10-Y41** ma słabsze upakowanie rdzenia hydrofobowego niż **O3.1.10**, ale wykazuje większą sztywność struktur drugorzędowych. Z kolei mutacja wprowadzona w wariantcie **O3.1.10-D41** ma efekt

destabilizujący. Może to oznaczać, że ułożenie N-końca minibiałka nie pokrywa się z założeniami projektowymi.



Rysunek 69. (A) Widma CD minibiałek wykonane w buforze fosforanowym o pH=7,4. (B) Krzywe denaturacji temperaturowej minibiałek zmierzone przy pomocy techniki nanoDSF. (C) Krzywe denaturacji temperaturowej minibiałek dla dwóch wybranych długości fal.

Tabela 31. Porównanie wartości temperatur denaturacji temperaturowej minibiałek wyznaczonej przy użyciu dwóch metod.

Minibiałko	$T_{M,CD\ 208}$ [°C]	$T_{M,CD\ 215}$ [°C]	$T_{M,nanoDSF}$ [°C]
O3.1.10-Y41**	> 70	83,15 ± 2,3	~50
O3.1.10-D41**	Brak punktu przegięcia	>50	>55

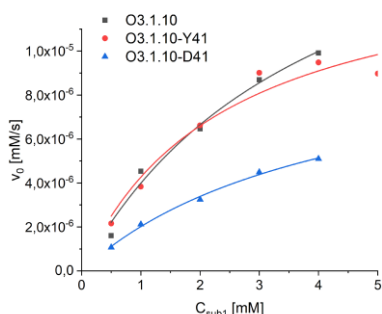
** - peptydy zsyntetyzowane przez Dr. Manisha Kumara z Katedry Chemii Bioorganicznej, Politechnika Wrocławska

3.3.6.3. Aktywność katalityczna

Przeprowadzono pomiary aktywności katalitycznej dwóch wariantów minibiałek, różniących się mutacją w pozycji 41. Otrzymane dane eksperymentalne wykazują zgodność z modelem Michaelisa-Menten, chociaż w badanym zakresie stężeń fenyloacetaldehydu (0,5–4 mM) nie zaobserwowano pełnego nasycenia enzymu (rysunek 70). Z tego względu wyznaczone parametry kinetyczne są obarczone znacznym błędem. Uwzględnienie nawet jednego dodatkowego punktu, $C_{\text{sub1}} = 5$ mM, skutkowało znacznym spadkiem obliczonej wartości K_M minibiałka **O3.1.10-Y41**. Zastosowanie wyższych stężeń substratu było jednak problematyczne ze względu na zachodzącą spontanicznie reakcję uboczną autokondensacji aldolowej fenyloacetaldehydu.

Dane uzyskane dla minibiałka z mutacją H41Y są niemal identyczne do wyjściowych, co sugeruje, że reszta histydyny i tyrozyny w tej pozycji są zamienne i funkcjonalnie równoważne.

Z kolei wariant **O3.1.10-D41** charakteryzuje się dwukrotnym spadkiem aktywności katalitycznej. Można przypuszczać, że wprowadzona reszta tworzy mostek solny, który zmniejsza reaktywność katalitycznej reszty lizyny. Ponadto zastąpienie dodatnio naładowanej reszty aminokwasem o ujemnym ładunku mogło wpłynąć na pK_a lizyny, którego utrzymanie jest konieczne do zajścia reakcji. Alternatywnym wyjaśnieniem jest obniżona zdolność stabilizacji stanu przejściowego, w szczególności stabilizowania częściowych ładunków ujemnych w kluczowych etapach reakcji.



Rysunek 70. Wykresy Michaelisa-Menten przy stałym stężeniu 4-nitrobenzaldehydu i rosnącym stężeniu fenyloacetaldehydu. Krzywe łączące punkty odpowiadają dopasowaniu do modelu Michaelisa-Menten, na podstawie którego wyznaczono parametry katalityczne.

Tabela 32. Parametry katalityczne minibiałek obliczone na podstawie dopasowania do modelu Michaelisa-Menten.

Minibiałko	k_{cat}/k_{uncat}	K_M [mM]	$k_{cat}/K_M \cdot 10^5$ [s ⁻¹ ·mM ⁻¹]	$v_0 \cdot 10^6$ [mM·s ⁻¹] dla C _{sub1} = 3 mM
O3.1.10	2765 ± 291	4,4 ± 1,9	4,8 ± 2,1	8,6
O3.1.10-Y41	1965 ± 28	2,4 ± 0,8	6,3 ± 2,1	9,0
O3.1.10-D41	1389 ± 92	4,3 ± 0,7	2,5 ± 0,4	4,5

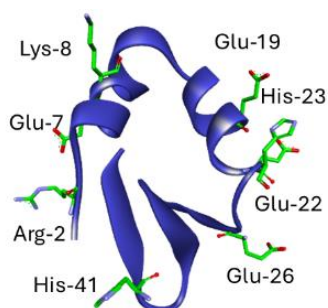
3.3.7. Optymalizacja rozkładu ładunków

3.3.7.1. Projektowanie

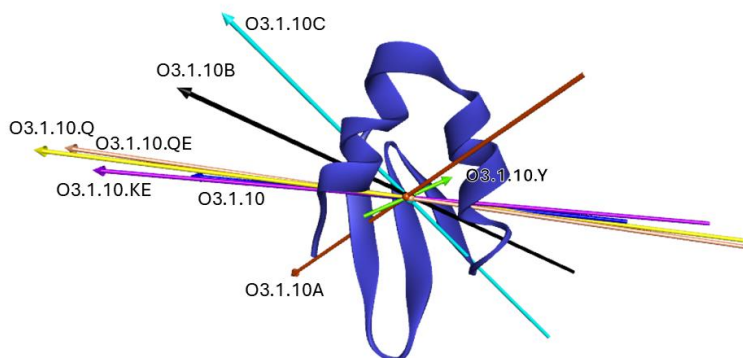
W kolejnym etapie optymalizacji aktywności katalitycznej minibiałka **O3.1.10** skoncentrowano się na rozkładzie ładunków wokół centrum aktywnego. Aby uzyskać odpowiednio ukierunkowane pola elektrostatyczne wytypowano kluczowe reszty aminokwasowe, a następnie modulowano ich ładunek, zmieniając moment dipolowy minibiałka. Wybór konkretnych aminokwasów był podyktowany ich położeniem na powierzchni minibiałka, tak, aby wykluczyć bezpośredni udział w katalizie (rysunek 71).

Modyfikacjami objęto także pozycję 41. Wcześniejsze eksperymenty wskazują, że znajdująca się tam histydyna może być zastąpiona tyroziną bez wpływu na architekturę miejsca aktywnego. Pozostałe wprowadzone mutacje mogą jednak zmieniać środowisko, w którym znajduje się aminokwas w pozycji 41, a razem z nim – efekt mutacji. W związku z tym, w niektórych sekwencjach uwzględniono także mutację H41Y (wariant **O3.1.10B**) lub H41D (wariant **O3.1.10C**).

Co ciekawe, wektor momentu dipolowego minibiałka **O3.1.10** przebiega równoległe do płaszczyzny β-kartki (rysunek 72).



Rysunek 71. Struktura minibiałka **O3.1.10**. Reprezentacją patyczkową przedstawiono reszty aminokwasowe poddane mutacjom.



Rysunek 72. Wektory momentu dipolowego obliczone względem geometrycznego środka minibiałka w programie Discovery Studio.

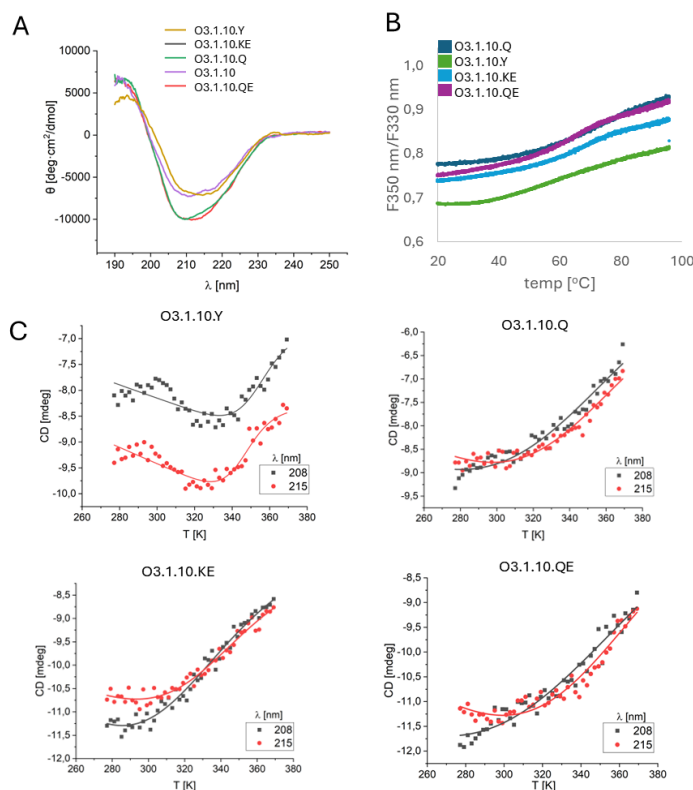
Tabela 33. Sekwencje analogów **O3.1.10**. W celu porównania z wyjściową sekwencją zawarto także sekwencję minibiałka **O3.1.10**. Kolorem zielonym zaznaczono reszty aminokwasowe, które uległy zmianie.

minibiałko	sekwencja
O3.1.10	KRQPY●EK ●KEDPRK●YE Y●EHVGEYEL HpPTLKWR KpPHEYELKL
O3.1.10.Q	KRQPY●QKL ●KEDPRK●YE Y●EQVGEYEL HpPTLKWR KpPHEYELKL
O3.1.10.KE	KRQPY●EKL ●KEDPRK●YE Y●EQVGEYEL HpPTLKWR KpPHEYELKL
O3.1.10.QE	KRQPY●QKL ●KEDPRK●YE Y●QEVGEYEL HpPTLKWR KpPHEYELKL
O3.1.10.Y	KEQPY●QEL ●KEDPRK●YR Y●RHVGEYEL HpPTLKWR KpPYEYELKL
O3.1.10A	KRQPY●EEL ●KEDPRK ●YE Y●QHVGQYEL HpPTLKWR KpPHEYELKL
O3.1.10B	KQQPY●QKL ●KEDPRK●YR Y●EYVGEYEL HpPTLKWR KpPYEYELKL
O3.1.10C	KQQPY●QKL ●KEDPRK●YR Y●EYVGEYEL HpPTLKWR KpPDEYELKL

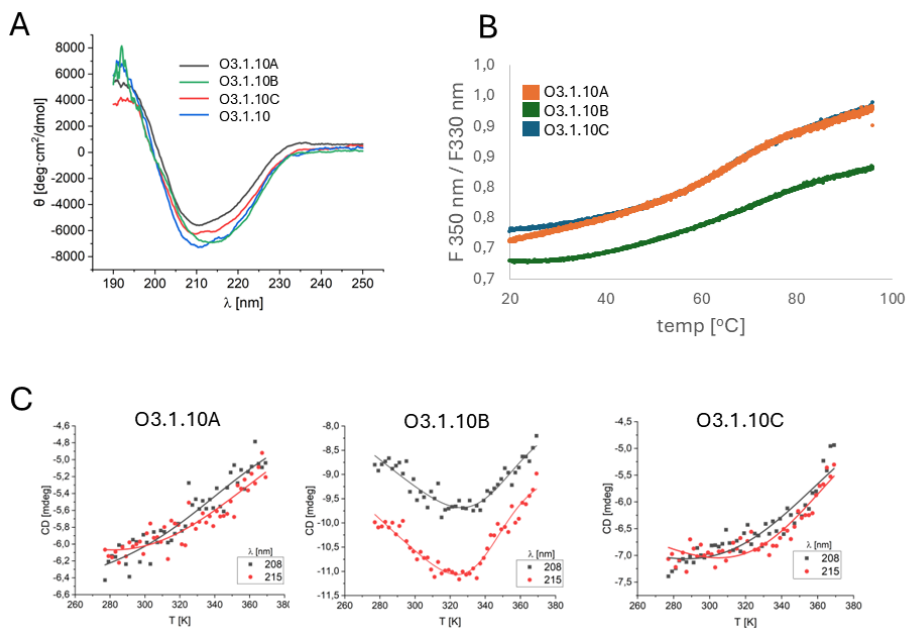
3.3.7.2. Analiza strukturalna

Analiza wyników otrzymanych z CD sugeruje, że modyfikacje rozkładu ładunków nie wywarły istotnego wpływu ani na strukturę drugorzędową większości minibiałek, ani na ich stabilność temperaturową (rysunek 73-74). Otrzymane krzywe denaturacji nie ulegają całkowitemu wypłaszczeniu, a więc i w tym przypadku nie dochodzi do całkowitego rozwinięcia minibiałek w wybranym zakresie temperatur. Zachowano także kooperatywny sposób zwijania się, o czym świadczy jednoczesne rozwijanie się struktur helikalnych i β -kartki. Wzrost sygnału CD obserwowany dla obydwu długości fali minibiałka **O3.1.10.Y** i **O3.1.10B** jest najprawdopodobniej związany z rozpuszczalnością próbki. Warto zaznaczyć, że obydwa warianty zawierają mutację H41Y – możliwe, że

sprzyja ona powstawaniu agregatów lub powstawaniu stabilnego stanu pośredniego, który powstaje w temperaturze ok. 50 °C, a następnie ulega denaturacji. Minibiałko **O3.1.10C** cechuje się nieznacznie lepszym kształtem krzywej denaturacji w wybranych długościach fali, której zakres stabilności ma miejsce do temperatury 47 °C. Możliwe, że wprowadzone mutacje dodatkowo stabilizują strukturę dzięki nowo powstałym oddziaływaniom elektrostatycznym. Ponieważ stabilizacja dotknęła obydwu elementów strukturalnych, jest prawdopodobne, że oddziaływania te wytworzyły się pomiędzy helisą a β -kartką. Wybrane mutacje nie wpłynęły więc znacznie na strukturę trzeciorzędową, a oddziaływania w obrębie rdzenia minibiałka zostały zachowane. Hipotezę tę potwierdzają krzywe denaturacyjne otrzymane drogą nanoDSF, które wykazują wyraźne punkty przegięcia w temperaturach 64-73 °C.



Rysunek 73. (A) Widma CD minibiałek wykonane w buforze fosforanowym o pH = 7,4. (B) Krzywe denaturacji temperaturowej minibiałek zmierzone przy pomocy techniki nanoDSF. (C) Krzywe denaturacji temperaturowej minibiałek dla dwóch wybranych długości fali.



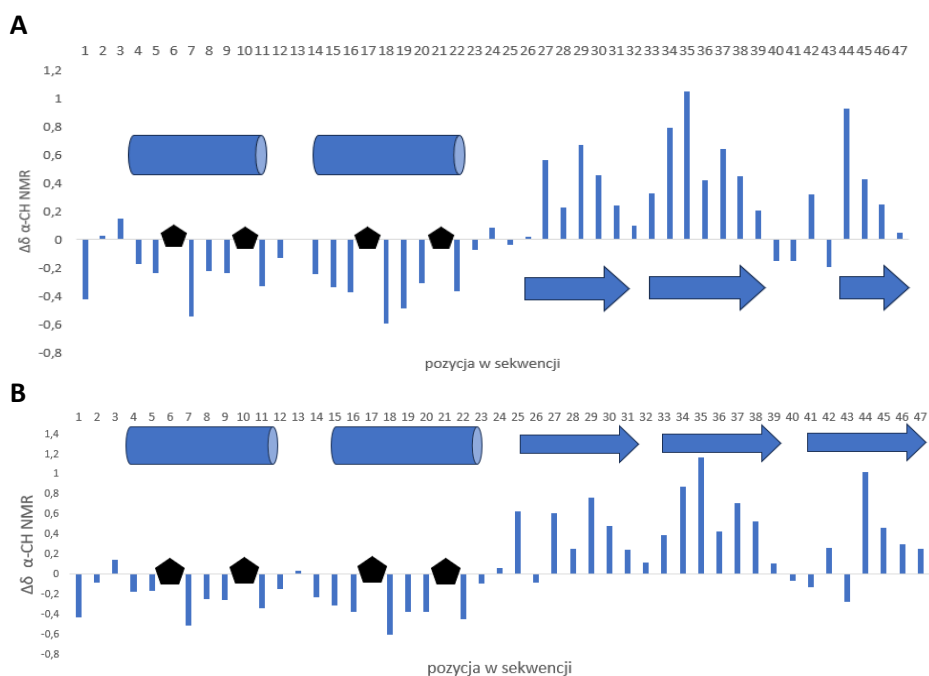
Rysunek 74. (A) Widma CD minibiałek **O3.1.10A**, **O3.1.10B** i **O3.1.10C** wykonane w buforze fosforanowym o pH = 7,4. (B) Krzywe denaturacji temperaturowej minibiałek zmierzone przy pomocy techniki nanoDSF. (C) Krzywe denaturacji temperaturowej minibiałek dla dwóch wybranych długości fali.

Tabela 34. Porównanie wartości temperatur denaturacji temperaturowej minibiałek wyznaczonej przy użyciu dwóch metod.

Minibiałko	$T_{M,CD\ 208}$ [°C]	$T_{M,CD\ 215}$ [°C]	$T_{M,nanoDSF}$ [°C]
O3.1.10.Q**	>60	>60	72,4
O3.1.10.KE**	~60	69,3 ± 6,9	67,8
O3.1.10.QE**	~60	~60	64,8
O3.1.10.Y**	~70	~70	60,3
O3.1.10A**	brak	>60	66,0
O3.1.10B	nietypowy przebieg		70,8
O3.1.10C**	>60	>60	66,1

** - peptydy zsyntetyzowane i oczyszczone przez Dr. Manisha Kumara z Katedry Chemii Bioorganicznej, Politechnika Wrocławska

Dla minibiałek **O3.1.10A** oraz **O3.1.10.Y** zmierzono widma ^1H -NMR oraz 2D NMR (TOCSY, NOESY) i przypisano wartości przesunięć chemicznych kolejnych aminokwasów w sekwencji. Wyznaczono różnice między eksperymentalnymi wartościami przesunięć chemicznych protonów H_α kolejnych reszt aminokwasowych a wartościami referencyjnymi, typowymi dla struktury kłębka statycznego (rysunek 75).¹⁰⁰ Ze względu na brak danych na temat reszty *trans*-ACPC, założono, że przyjmuje ona strukturę sąsiadujących z nią reszt. Ujemne wartości przesunięć ($\Delta\delta < 0$) są charakterystyczne dla struktur helikalnych, a dodatnie ($\Delta\delta > 0$) dla β -kartki. Na podstawie obliczonych wartości $\Delta\delta$ określono struktury drugorzędowe, w których tworzeniu biorą udział poszczególne reszty. Otrzymane wyniki pokrywają się z modelem teoretycznym, a różnice między wariantami minibiałka są nieznaczne. Największą różnicę można zauważyć w pozycji 25 (Gly) oraz 28 (Glu); w przypadku minibiałka **O3.1.10.Y** glutaminian wchodzi w skład pierwszej nici β -kartki, co świadczy o jej poprawnym kształtowaniu się. Ze względu na zmieniający się znak $\Delta\delta$ reszt 39-43, znajdujący się w tym regionie zwrot najprawdopodobniej obejmuje nie tylko D-Pro-L-Pro, ale tworzy większą pętlę.



Rysunek 75. Drugorzędowe przesunięcia chemiczne (A) minibiałka **O3.1.10.Y** (B) minibiałka **O3.1.10A**.

3.3.7.3. Aktywność katalityczna

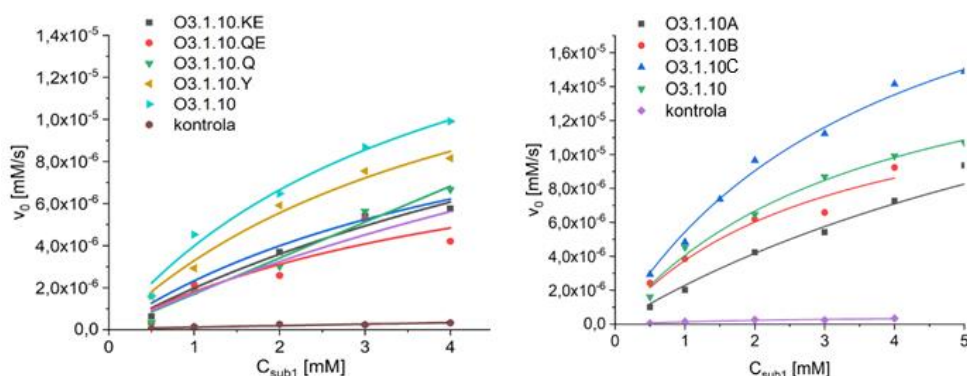
Wykonano pomiary aktywności katalitycznej dla 7 związków. Wyniki wskazują na istotny wpływ rozkładu ładunków na wydajność katalizy. Otrzymane v_0 dla 3 mM stężenia fenylacetaldehydu zawierają się w zakresie od 5,5 do $11,2 \cdot 10^{-6} \text{ mM} \cdot \text{s}^{-1}$ (rysunek 76).

Wariant **O3.1.10C** to minibiałko o poprawionej specyficzności i aktywności. Zmiana rozkładu ładunków pozwoliła więc na 1,3-krotny wzrost parametru k_{cat}/k_{uncat} , z ok. 2700 do 3500. Jest to wyjątkowo interesujący wynik, ponieważ wariant ten zawiera mutację H41D, która, wprowadzona do minibiałka **O3.1.10**, powodowała znaczny spadek aktywności. Z kolei podstawienie H41Y pozostaje na poziomie porównywalnym z minibiałkiem wyjściowym. Wynik ten sugeruje, że przeprojektowanie sieci oddziaływań elektrostatycznych na powierzchni minibiałka spowodowało znaczne zmiany środowiska, w którym znajduje się reszta asparaginianu. W nowym kontekście wprowadzenie ujemnie naładowanego Asp pozytywnie wpływa na przyspieszenie reakcji. Może to być związane z wywieranym polem katalitycznym lub z oddziaływaniem Asp z C-końcem minibiałka. Reszta ta może także obniżać energię TS podczas ataku nukleofilowej reszty Lys na węgiel karbonylowy fenylacetaldehydu lub funkcjonować jako donator/akceptor protonów.

Warianty **O3.1.10.Q**, **O3.1.10.KE** i **O3.1.10.QE**, o wzmocnionym momencie dipolowym w tym samym kierunku, co wyjściowy, wykazały ok. 2-krotny spadek aktywności. Można więc wnioskować, że pole katalityczne wywierane na miejsce aktywne przez **O3.1.10** nie było optymalne. Alternatywnie, za ten efekt może odpowiadać uczestniczenie niektórych z wybranych reszt w oddziaływaniach orientujących odpowiednio pierwszą strefę oddziaływań, a ich zmiana doprowadziła do zaburzenia geometrii miejsca aktywnego. Wyniki otrzymane dla **O3.1.11.KE**, którego sekwencja zawiera pojedynczą mutację H23Q, może sugerować kluczową rolę tej pozycji w utrzymaniu aktywności katalitycznej (rysunek 77).

Zbadano również wpływ pH buforu (50 mM KPB, zakres 6–8) na początkową szybkość reakcji minibiałek **O3.1.10B** i **O3.1.10C** (rysunek 78). W przypadku obydwu związków ilość uzyskanego produktu rośnie proporcjonalnie do wzrostu zasadowości

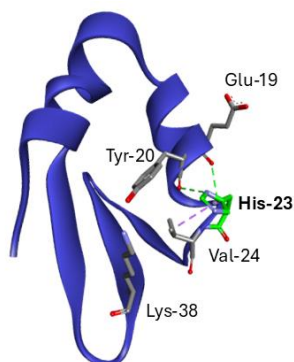
roztworu. Efekt ten jest związany z przesunięciem równowagi kwasowo-zasadowej w stronę aktywnej formy katalitycznej lizyny.



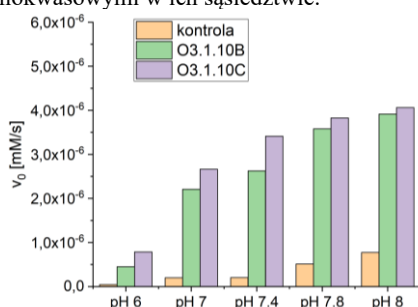
Rysunek 76. Wykresy Michaelisa-Menten przy stałym stężeniu 4-nitrobenzaldehydu i rosnącym stężeniu fenyloacetaldehydu. Krzywe łączące punkty odpowiadają dopasowaniu do modelu Michaelisa-Menten, na podstawie którego wyznaczono parametry katalityczne.

Tabela 35. Parametry katalityczne minibialek obliczone na podstawie dopasowania do modelu Michaelisa-Menten.

Minibiałko	k_{cat}/k_{uncat}	K_M [mM]	$k_{cat}/K_M \cdot 10^5$ [s ⁻¹ ·mM ⁻¹]	$v_0 \cdot 10^6$ [mM·s ⁻¹] dla $C_{sub1} = 3$ mM
O3.1.10.Q	Złe dopasowanie			5,6
O3.1.10.KE	Złe dopasowanie			5,4
O3.1.10.QE	Złe dopasowanie			5,5
O3.1.10.Y	2227 ± 174	4,1 ± 0,8	4,2 ± 0,8	7,5
O3.1.10A	3121 ± 667	9,4 ± 5,2	2,5 ± 1,4	5,4
O3.1.10C	3545 ± 237	3,9 ± 0,7	6,8 ± 1,3	11,2
O3.1.10B	1985 ± 166	3,0 ± 1,4	5,0 ± 2,3	6,0



Rysunek 77. Wymodelowana struktura minibiałka **O3.1.10** z zaznaczoną pozycją 23 (kolor zielony) i przedstawionymi resztami aminokwasowymi w ich sąsiedztwie.



Rysunek 78. Początkowa szybkość reakcji katalizowanej przez **O3.1.10B** i **O3.1.10C** dla 0,5 mM fenyloacetaldehydu i 4 mM 4-nitrobenzaldehydu, w buforze 50 mM KPB dla różnych pH.

3.3.8. Weryfikacja miejsca aktywnego

Istotność zmian w pozycjach 41 i 23, które według modelu znajdują się w sąsiedztwie miejsca aktywnego, zdaje się potwierdzać jego położenie. W celu jednoznacznego potwierdzenia katalicznego charakteru Lys-38 zsyntetyzowano mutanty dwóch najlepszych katalizatorów, w których zamieniono ją na argininę lub alaninę – **O3.1.10-R**, **O3.1.10-A** oraz **O3.1.10-C-A** (tabela 36).

Tabela 36. Sekwencje analogów **O3.1.10**. Kolorem niebieskim zaznaczono reszty aminokwasowe, które uległy zmianie.

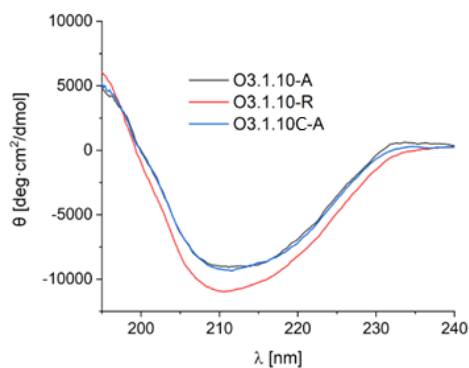
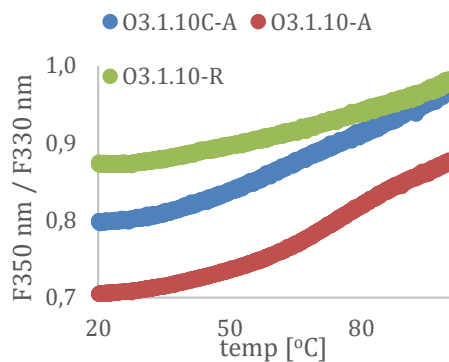
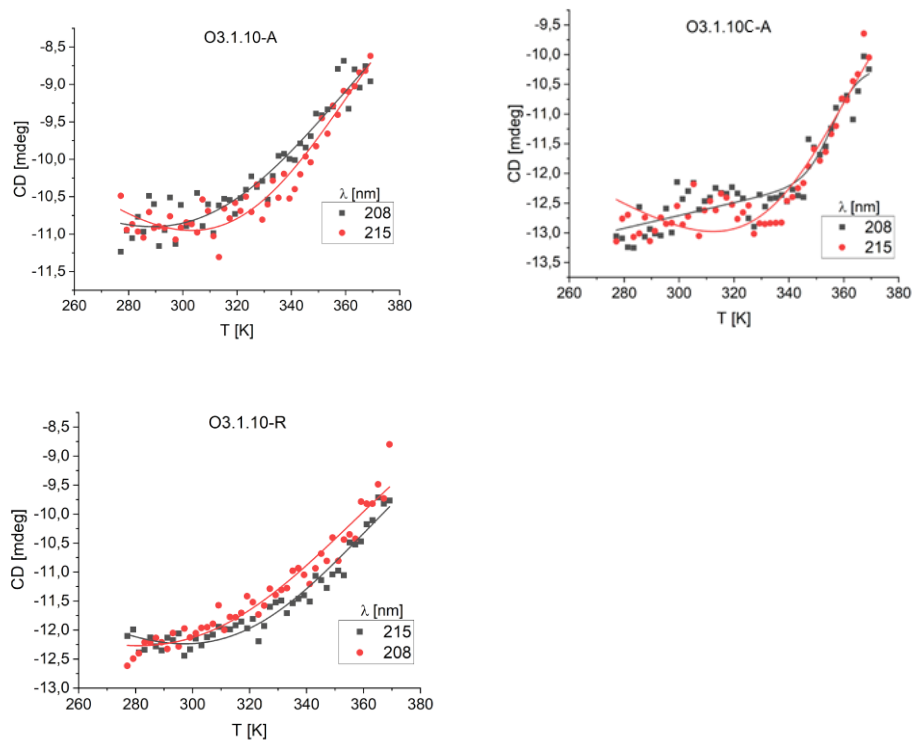
minibiałko	sekwencja
O3.1.10-R	KRQPY● EKL ●KEDPRK●YE Y●EHVGEYEL HpPTLKWR ^R p PHEYELKL
O3.1.10-A	KRQPY● EKL ●KEDPRK●YE Y●EHVGEYEL HpPTLKWR ^A p PHEYELKL
O3.1.10C-A	KQQPY●QKL ●KEDPRK●YR Y●EYVGEYEL HpPTLKWR ^A p PDEYELKL

3.3.8.1. Analiza strukturalna

Minibiałka, w których resztę Lys-38 zastąpiono resztą alaniny lub argininy, porównano względem oryginalnych sekwencji na podstawie zmierzonych widm CD i krzywych temperaturowych.

Przebieg widm CD nie sugeruje zmian strukturalnych badanych związków (rysunek 79). Wykazują one sygnał rozciągający się od ok. 208 nm do ok. 218 nm, analogicznie do minibiałek **O3.1.10** i **O3.1.10C**. Krzywe temperaturowe mierzone przy długości fali 208 i 215 nm charakteryzują się szerokim zakresem stabilności, a proces rozwijania się rozpoczyna się ok. 45 °C. Nie dochodzi także do całkowitego rozwinięcia struktury w badanym zakresie temperatur. Wyniki te odpowiadają danym uzyskanym dla wyjściowych związków.

Pomiary nanoDSF uwidaczniają jednak zmiany ułożenia reszt tryptofanu i tyrozyny. Niezmieniona pozostaje krzywa uzyskana dla minibiałka **O3.1.10-A**, z wyraźnym punktem przegięcia ok. 75 °C. Wariant **O3.1.10C-A** wykazuje zmianę powyżej temperatury 80°C — zamiast występującego poprzednio wypłaszczenia krzywej, widoczna jest kontynuacja rozwijania się minibiałka. Możliwe, że zaobserwowane wcześniej plateau odpowiadało alternatywnej konformacji przyjmowanej przez minibiałko, a nie całkowitemu rozwinięciu. Zamiana zasadowej reszty aminokwasowej na niewielką alaninę mogła wpłynąć na stabilność struktur przejściowych. Ostatni wariant, **O3.1.10-R**, charakteryzuje się wysokim stosunkiem emisji F350 nm/F330 nm i brakiem wyraźnego punktu przegięcia. Wyższa wartość początkowa tego stosunku sugeruje, że reszta tryptofanu w tym wariantcie znajduje się w bardziej polarnym otoczeniu niż w przypadku sekwencji natywnej, co może wynikać z bliskiego sąsiedztwa silnie polarnej grupy guanidyniowej argininy. Możliwe, że mutacja K38R wywołuje lokalne zmiany w upakowaniu rdzenia hydrofobowego.

A**B****C**

Rysunek 79. (A) Widma CD minibiałek wykonane w buforze fosforanowym o pH = 7,4. (B) Krzywe denaturacji temperaturowej minibiałek zmierzone przy pomocy techniki nanoDSF. (C) Krzywe denaturacji temperaturowej minibiałek dla dwóch wybranych długości fali.

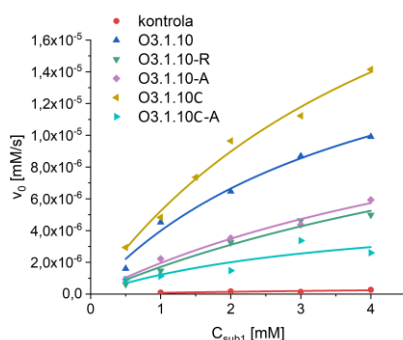
Tabela 37. Porównanie wartości temperatur denaturacji temperaturowej minibiałek wyznaczonej przy użyciu dwóch metod.

Minibiałko	$T_{M,CD\ 208}[^{\circ}\text{C}]$	$T_{M,CD\ 215}[^{\circ}\text{C}]$	$T_{M,nanoDSF}[^{\circ}\text{C}]$
O3.1.10-A**	>60	>60	75,8
O3.1.10-R**	>60	>60	Brak punktu przegięcia
O3.1.10C-A**	$84,2 \pm 2,8$	> 70	>50

** - peptydy zsyntetyzowane i oczyszczone przez Dr. Manisha Kumara z Katedry Chemii Bioorganicznej, Politechnika Wrocławska

3.3.8.2. Aktywność katalityczna

Przeprowadzono pomiary aktywności katalitycznej dla trzech związków pozbawionych katalitycznej lizyny (rysunek 80). Wykazały one około trój- lub czterokrotny spadek aktywności w porównaniu do minibiałek wyjściowych. Przyspieszenie reakcji wciąż jednak utrzymuje się na wysokim poziomie, wynoszącym około 1000-krotność reakcji niekatalizowanej. Tak znaczące zachowanie aktywności może wynikać z przejścia funkcji katalitycznej przez inną resztę lizyny lub stanowić wypadkową reaktywności kilku innych lizyn obecnych w cząsteczce. Nie można również wykluczyć, że w układzie tym zadziałał zupełnie inny mechanizm katalityczny.



Rysunek 80. Wykresy Michaelisa-Menten przy stałym stężeniu 4-nitrobenzaldehydu i rosnącym stężeniu fenyloacetaldehydu. Krzywe łączące punkty odpowiadają dopasowaniu do modelu Michaelisa-Menten, na podstawie którego wyznaczono parametry katalityczne.

Tabela 38. Parametry katalityczne minibiałek obliczone na podstawie dopasowania do modelu Michaelisa-Menten.

Minibiałko	k_{cat}/k_{uncat}	K_M [mM]	$k_{cat}/K_M \cdot 10^5$ [s ⁻¹ ·mM ⁻¹]	$v_0 \cdot 10^6$ [mM·s ⁻¹] dla C _{sub1} = 3 mM
O3.1.10	2765 ± 291	4,4 ± 1,9	4,8 ± 2,1	8,6
O3.1.10-R	989 ± 59	2,8 ± 1,4	2,7 ± 1,4	4,6
O3.1.10-A	Złe dopasowanie			4,4
O3.1.10C	3545 ± 237	3,9 ± 0,7	6,8 ± 1,3	11,2
O3.1.10C-A	Złe dopasowanie			3,4

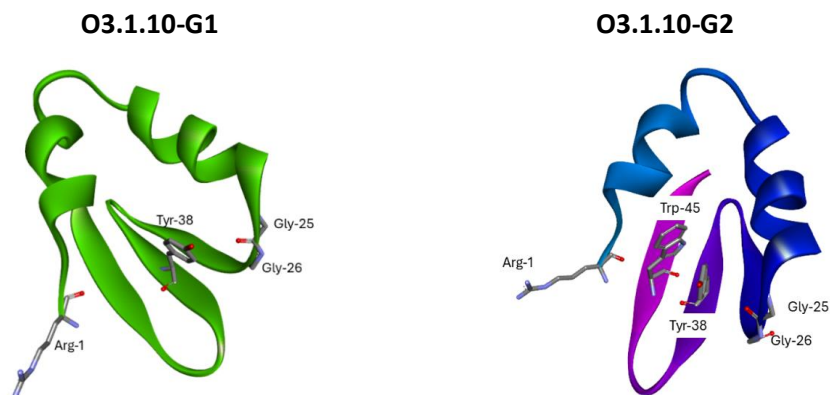
3.3.9. Wydłużenie pętli

W kolejnym etapie skupiono się na wprowadzaniu modyfikacji strukturalnych, dzięki którym możliwe zostałyby potwierdzenie struktury minibiałka za pomocą 2D NMR.

Przyjęto, że obecność kilku konformacji, przejawiających się jako dodatkowe piki na spektrum ¹H NMR dla próbki **O3.1.10**, może wynikać z przesunięć helis względem β-kartki. Zaproponowano dwa mutanty, **O3.1.10-G1** i **O3.1.10-G2** (tabela 39, rysunek 81). W obydwu wprowadzono dodatkową glicynę w obrębie pętli w celu umożliwienia połączonym fragmentom bardziej swobodnego ułożenia się względem siebie, bez wymuszonych naprężeń konformacyjnych. Dodatkowo wprowadzono tyrozinę w pozycji 38 (poprzednio 36), a N-końcową lizynę zamieniono na arginę.

Tabela 39. Sekwencje analogów **O3.1.10**. W celu porównania z wyjściową sekwencją zawarto także sekwencję minibiałka **O3.1.10**. Kolorem niebieskim zaznaczono reszty aminokwasowe, które uległy zmianie.

minibiałko	sekwencja
O3.1.10	KRQPY●EKL ●KEDPRK●YE Y●EHVGEYEL HpPTLKWRKp PHEYELKL
O3.1.10-G1	RRQPY●EKL ●KEDPRK●YE Y●EHV●GEYEL HpPTLK●RKp PHEYELKL
O3.1.10-G2	RRQPY●EKL ●KEDPRK●YE Y●EHV●GEYEL HpPTLK●RKp PHEWELKL

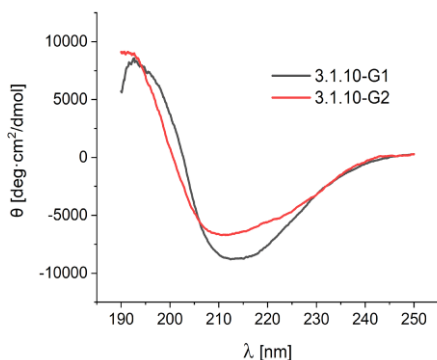
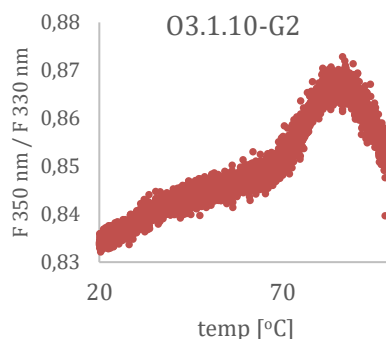
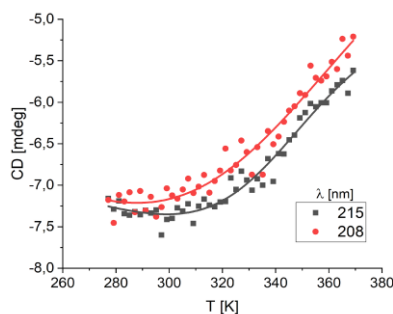
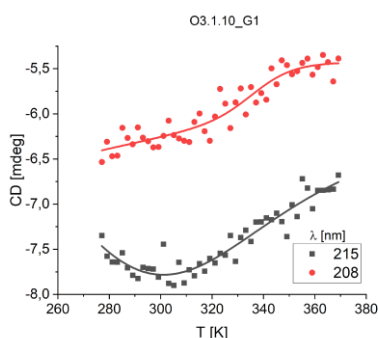


Rysunek 81. Wymodelowane struktury **O3.1.10-G1** i **O3.1.10-G2**. Reprezentacją patyczkową przedstawiono wprowadzone mutacje.

3.3.9.1. Analiza strukturalna

Wstępną analizę strukturalną zaprojektowanych związków oparto na pomiarach CD (rysunek 82). Widmo zmierzone dla minibiałka **O3.1.10-G2** wykazuje obecność dodatkowego minimum dla długości fali 230 nm, podobnie jak w poprzednio omawianym **O3.1.10YW2** (rysunek 66). Oba minibiałka charakteryzują się zamianą pozycji Trp w obrębie rdzenia hydrofobowego, co przekłada się na widoczny na widmie sygnał oddziaływań między grupami aromatycznymi. Wariant **O3.1.10-G2** wykazuje także wysoką stabilność temperaturową, a rozwijanie się zachodzi jednocześnie dla fragmentów helikalnych i β -kardki.

Krzywa otrzymana dla minibiałka **O3.1.10-G1** nie wskazuje na znaczne zmiany konformacyjne względem wyjściowej sekwencji **O3.1.10**. Brak reszty tryptofanowej w sekwencji uniemożliwił wykorzystanie metody nanoDSF do pełniejszej analizy. Zmiany sygnału CD w trakcie grzania próbki wskazują na częściowe rozwinięcie struktury ok. 65 °C.

A**B****C**

Rysunek 82. (A) Widma CD minibiałek wykonane w buforze fosforanowym o pH = 7,4. Wartości na osi y znormalizowano ze względu na liczbę aminokwasów. (B) Krzywe denaturacji temperaturowej minibiałek zmierzone przy pomocy techniki nanoDSF. (C) Krzywe denaturacji temperaturowej minibiałek dla dwóch wybranych długości fali.

Tabela 40. Porównanie wartości temperatur denaturacji temperaturowej minibiałek wyznaczonej przy użyciu dwóch metod.

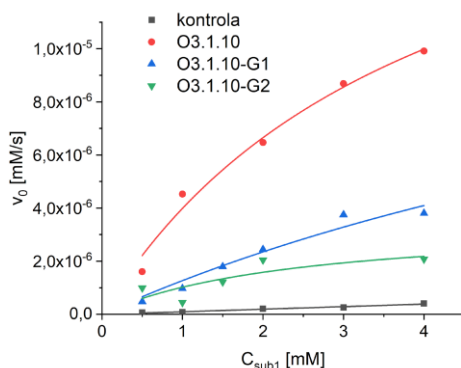
Minibiałko	$T_{M,CD\ 208}[^{\circ}\text{C}]$	$T_{M,CD\ 215}[^{\circ}\text{C}]$	$T_{M,nanoDSF}[^{\circ}\text{C}]$
03.1.10-G1	$65,4 \pm 5,1$	>60	Brak Trp
03.1.10-G2	>60	$74,6 \pm 5,5$	73,9

Dla minibiałka **03.1.10-G1** wykonano pomiary 2D NMR. Zmierzono widmo ^1H -NMR, TOCSY i NOESY dla próbki o stężeniu 2,6 mg/ml rozpuszczonej w wodzie z 10% D_2O (v/v). Analiza widm 2D NMR wykazała obecność dodatkowych, powielonych sygnałów, a także obszarów o znacznym zlewaniu się pików. Zjawiska te stanowią

spektroskopowy dowód na to, że badane minibiałko nie przyjmuje pojedynczej konformacji. W rezultacie przypisanie sygnałów nie było możliwe.

3.3.9.2. Aktywność katalityczna

Nowo otrzymane mutanty **O3.1.10-G1** i **O3.1.10-G2** wykazują znaczny spadek aktywności katalitycznej w porównaniu do oryginalnej sekwencji (rysunek 83, tabela 41). Najbardziej prawdopodobną przyczyną tego zjawiska jest wprowadzenie reszty tyrozyny w pozycji 38. Podobny spadek aktywności zaobserwowano w przypadku wariantów **O3.1.10Y**, **YW** i **YW2**, zawierających analogiczną mutację. Nie można także wykluczyć, że N-końcowa reszta Lys-1 brała aktywny udział w katalizie. Należy wziąć pod uwagę, że wszystkie wprowadzone mutacje mogą zmieniać konformację minibiałka w niekorzystny sposób, zaburzając prawidłową architekturę miejsca aktywnego.



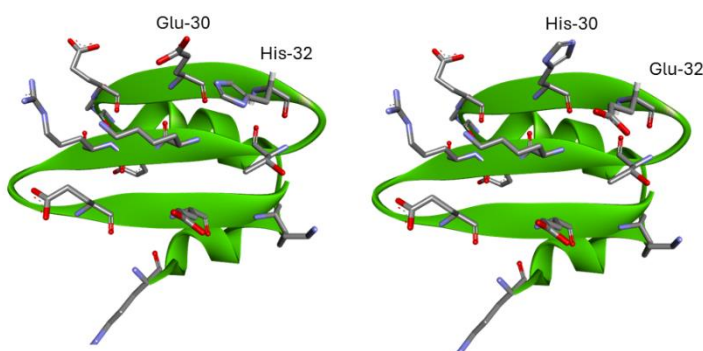
Rysunek 83. Wykresy Michaelisa-Menten przy stałym stężeniu 4-nitrobenzaldehydu i rosnącym stężeniu fenyloacetaldehydu. Krzywe łączące punkty odpowiadają dopasowaniu do modelu Michaelisa-Menten, na podstawie którego wyznaczono parametry katalityczne.

Tabela 41. Parametry katalityczne minibiałek obliczone na podstawie dopasowania do modelu Michaelisa-Menten.

Minibiałko	k_{cat}/k_{uncat}	K_M [mM]	$k_{cat}/K_M \cdot 10^5$ [s ⁻¹ ·mM ⁻¹]
O3.1.10_G1	1567 ± 189	7,9 ± 3,5	1,5 ± 0,7
O3.1.10_G2	Złe dopasowanie		

3.3.10. Zmniejszenie symetrii β -kartki

Dodatkowe i zlewające się sygnały pojawiające się na widmie 2D NMR **O3.1.10-G1** mogą sugerować, że struktura przyjmuje dodatkową konformację, a pozycje niektórych aminokwasów nie są dobrze zdefiniowane. Wysznuło hipotezę, że przyczynę stanowi znaczna symetria β -kartki, co powoduje, że jej nici mogą zamienić się miejscami. Aby zdestabilizować niepożądane konformacje i wymusić wyłącznie jedno preferowane ułożenie układu, zaprojektowano nowy wariant minibiałka, **O3.1.10-G1.1**, w którym Glu-30 i His-32 zostały zamienione miejscami w sekwencji, przełamując lokalną symetrię (rysunek 84).

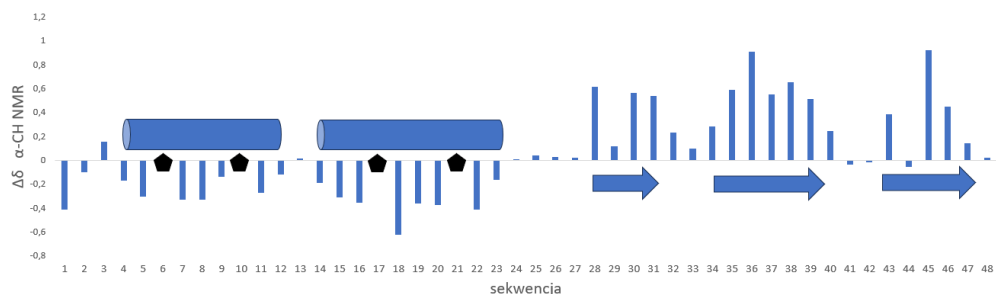


Rysunek 84. Model minibiałka **O3.1.10-G1** przedstawiający reszty aminokwasowe wchodzące w skład β -kartki (po lewej) oraz zaproponowany analog **O3.1.10-G1.1** (po prawej).

3.3.10.1. Struktura NMR

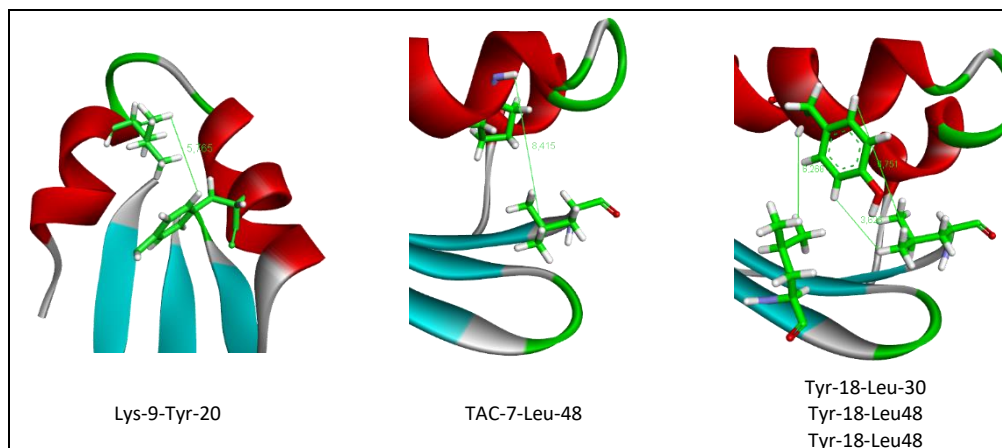
Minibiałko **O3.1.10-G1.1** przeanalizowano na podstawie 2D NMR. Zarejestrowano widma ^1H -NMR, TOCSY i NOESY dla próbek o stężeniu 2,6 mg/ml, rozpuszczonych w wodzie z 10% D_2O (v/v). Dane eksperymentalne potwierdzają topologię minibiałka.

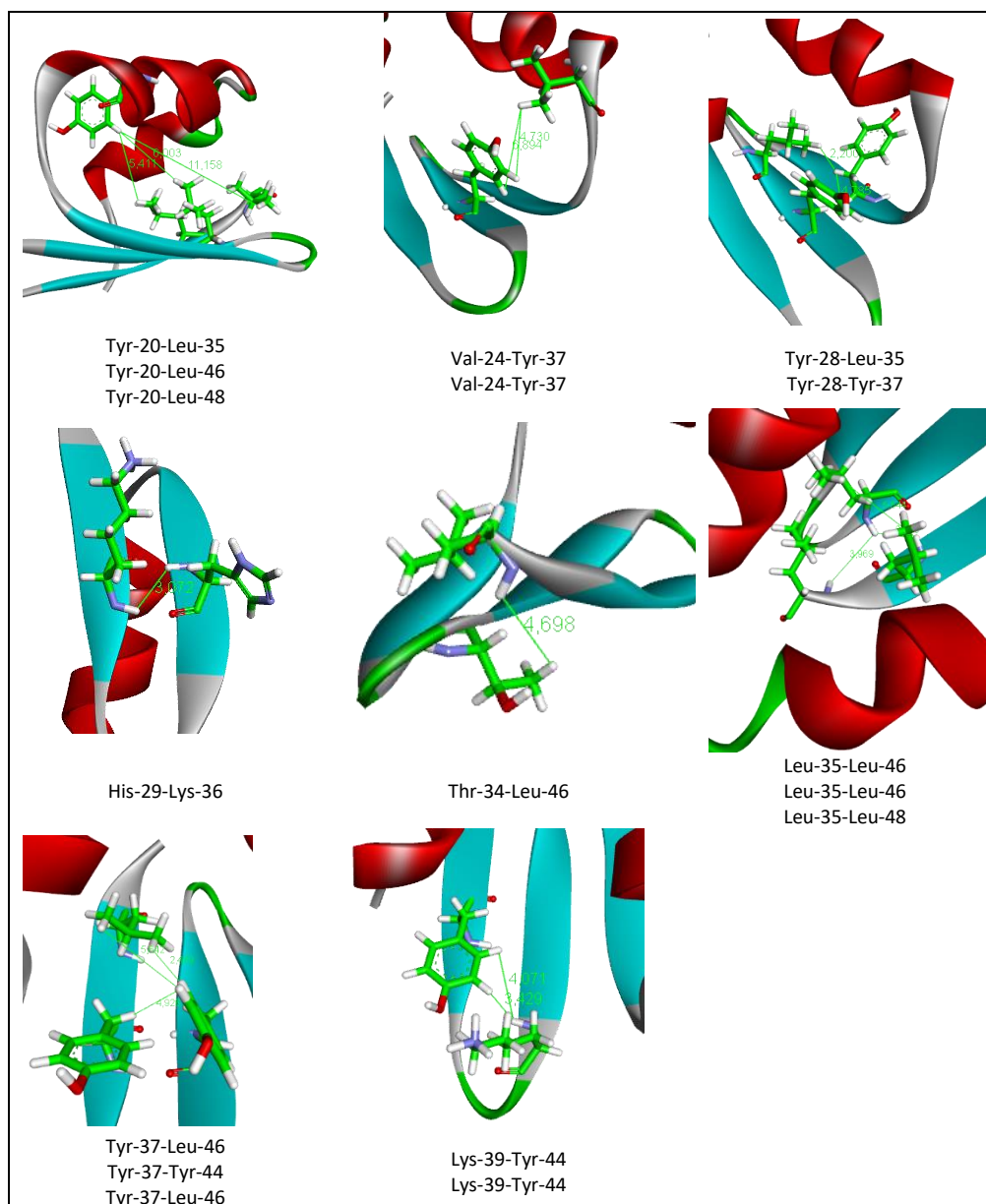
Początkowo zidentyfikowano przyjmowane elementy struktury drugorzędowej minibiałka na podstawie drugorzędowych przesunięć chemicznych. Na tej podstawie wywnioskowano, że reszty 4-12 i 14-23 przyjmują konformację helisy, a reszty 28-48 tworzą β -kartkę (rysunek 85). Wyniki te w pełni korelują z modelem teoretycznym minibiałka.



Rysunek 85. Drugorzędowe przesunięcia chemiczne minibiłka **O3.1.10-G1.1**.

Dalsza analiza zarejestrowanych widm pozwoliła na wstępne wyznaczenie struktury. Zaobserwowano ponad 60 oddziaływań dalekiego zasięgu (pomiędzy aminokwasami oddalonymi od siebie o więcej niż 4 reszty w sekwencji). Wszystkie z nich pokrywają się z przewidywaniami modelowymi, a wybrane przykłady zilustrowano na rysunku 86. Co istotne, zidentyfikowano zarówno oddziaływania pomiędzy β -kartką a helisą, jak i pomiędzy poszczególnymi niemi β -kartki oraz między helisami.



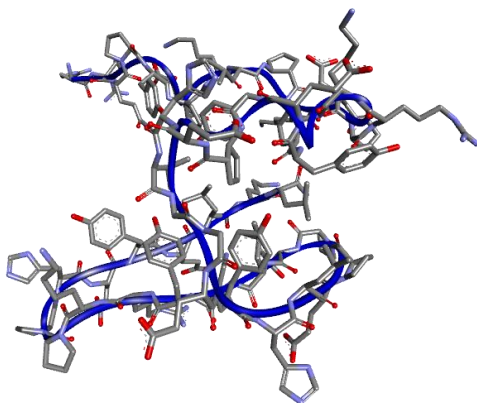


Rysunek 86. Wybrane oddziaływania dalekiego zasięgu, które pokrywają się z zaprojektowanym modelem minibiółka.

W celu wyznaczenia struktury minibiółki wykorzystano program XPLOR, w którym wygenerowano 100 wstępnych struktur pasujących do danych eksperymentalnych z 2D NMR. Najlepszy z wygenerowanych modeli przedstawiono na rysunku 87. W celu poprawienia jego jakości konieczne jest przypisanie słabszych

oddziaływań pomiędzy N-końcową helisą a β -kartką, które nie zostały uwzględnione w początkowych obliczeniach.

Niemniej jednak wstępne rozwiązanie przyjmuje topologię HHEEE, odpowiadającą założeniom projektowym. Najmniej zdefiniowane pozostaje ułożenie pierwszej helisy i N-końca. Można także zaobserwować przesunięcie helis na powierzchni β -kartki, które może prowadzić do oddalenia od siebie reszt katalitycznych. Prawdopodobne jest, że to zjawisko odpowiada za spadek aktywności katalitycznej w wariantach z mutacją W37Y. Do weryfikacji tej hipotezy konieczne będzie porównanie wyników 2D NMR innych minibiałek z tej serii. Potwierdzenie struktury **O3.1.10-G1.1** stanowi szablon, który znacznie ułatwi przypisywanie sygnałów na widmach jego analogów.



Rysunek 87. Przykładowa struktura wygenerowana w programie XPLOR na podstawie danych uzyskanych z 2D NMR minibiałka **O3.1.10-G1.1**.

3.3.11. Podsumowanie

W ramach drugiej części badań zaprojektowano, zsyntetyzowano i scharakteryzowano 35 minibiałek o topologii HHEEE, zawierających w helisach po dwie reszty aminokwasowe *trans*-ACPC, których obecność stabilizuje struktury helikalne. Rusztowania i sekwencje peptydów z tej serii zbudowano zupełnie *de novo*, wykorzystując metody wspomagane komputerowo.

Otrzymano 14 minibiałek o wysokiej stabilności termicznej ($T_M > 60^\circ\text{C}$), co potwierdzono spójnymi wynikami uzyskanymi za pomocą dwóch komplementarnych metod, CD i nanoDSF. Dla jednego z minibiałek rozwiązano strukturę przestrzenną na

podstawie pomiarów 2D NMR, a dane eksperymentalne wykazują dużą zgodność z założeniami projektowymi. Choć wariant ten nie wykazuje aktywności katalitycznej, wysokie podobieństwo sekwencyjne i strukturalne pozostałych minibiałek z tej serii znacząco ułatwi rozwiązanie kolejnych struktur.

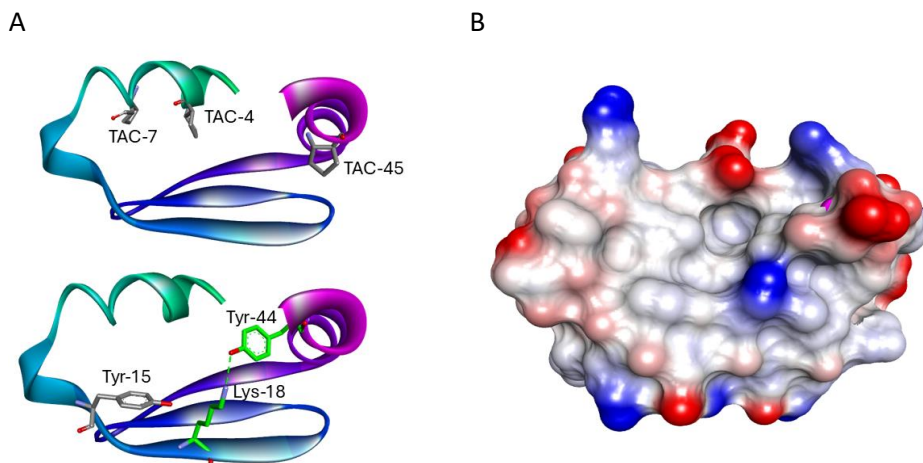
Wyłoniono 4 minibiałka wyróżniające się aktywnością katalityczną (**O3.1.10**, **O3.1.10-Y41**, **O3.1.10.Y**, **O3.1.10C**). Najaktywniejszy wariant, **O3.1.10C**, charakteryzował się k_{cat}/K_M ok. $6,8 \pm 1,3 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$. Przyspieszenie względem reakcji niekatalizowanej wyniosło ok. 3500-krotność. Jest to wynik zbliżony do innych znanych katalizatorów minibiałkowych, jednak daleki od wartości osiąganych przez natywne enzymy. W celu określenia przyczyn konieczne jest określenie dokładnej geometrii miejsca aktywnego oraz dostępności i ładunku przyjętego przez Lys-38. Warto jednak zaznaczyć, że w literaturze nie znaleziono doniesień, które opisywałyby katalizę badanej reakcji 4-nitrobenzaldehydu z fenyloacetaldehydem przez natywne lub sztuczne enzymy.

Zaobserwowano także zależność między aktywnością katalityczną a momentem dipolowym minibiałka oraz potwierdzono udział reszty Lys-38 w katalizie. Tym samym spełniono założenia projektowe, a uzyskane wyniki mogą być wykorzystane w kolejnych badaniach. Otrzymane rusztowania minibiałkowe stanowią sztywne struktury zawierające zarówno helisy, jak i β -kartkę, co czyni je obiecującą bazą do wprowadzenia nowych funkcji biologicznych.

3.4. Minibiałka *de novo* o topologii HEEEH

3.4.1. Projektowanie

Drugi zestaw minibiałek *de novo* zaprojektowano tak, aby pomiędzy helisami powstała przestrzeń tworząca wnękę. Helisy, zawierające β -aminokwas *trans*-ACPC, ułożono na powierzchni β -kartki pod kątem $\sim 60^\circ$ względem siebie. N-końcową helisę połączono z pozostałą częścią struktury pętlą, która przypomina pojedynczy zwrot helisy. Druga helisa nie jest poprzedzona pętlą, przez co unosi się nad β -kartką pod kątem ostrym. Przyjęto hipotezę, że takie ułożenie usztywni szkielet peptydu, zmniejszając prawdopodobieństwo zbliżenia się do siebie helis prowadzącego do zamknięcia wnęki. W obrębie wnęki umieszczono katalityczną lizynę i tyrozinę, których nie obejmowało dalsze generowanie sekwencji. Podobnie ustalono stałe położenie *trans*-ACPC (w pozycjach 4, 7 i 45) oraz reszt D-proliny i L-proliny wchodzących w skład β -zwrotów (rysunek 88). Pozostałe reszty dobrano korzystając z oprogramowania Rosetta, protokołu FastDesign, a sekwencje o najlepszej ocenie poddano dodatkowej selekcji na podstawie wyników przewidywań wygenerowanych przez Alphafold3 (rysunek 89, tabela 42).

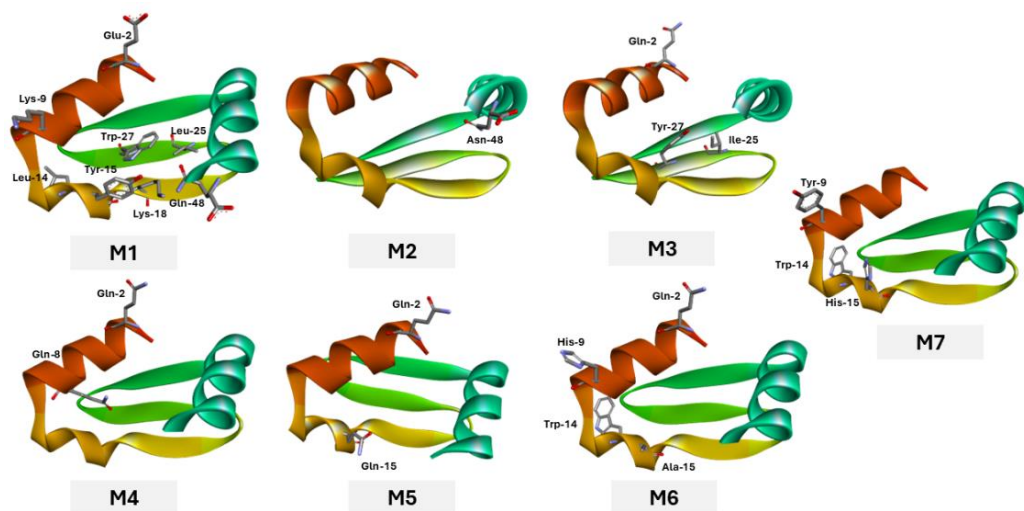


Rysunek 88. (A) Wymodelowany szkielet minibiałek o topologii **HEEEH** z zaznaczonymi pozycjami reszt aminokwasowych *trans*-ACPC (TAC) oraz resztami tworzącymi załazek miejsca aktywnego. Kolorem zielonym zaznaczono te reszty, których nie obejmowało generowanie sekwencji. (B) Wymodelowana powierzchnia minibiałka M3, pokolorowana zgodnie z wypadkowym ładunkiem.

Tabela 42. Sekwencje minibiałek o topologii **HEEEH**. Kolorem niebieskim zaznaczono reszty aminokwasowe, którymi analogi różnią się od **M1**.

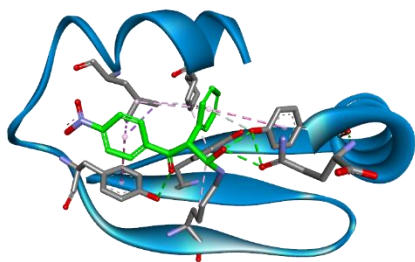
Minibiałko	Sekwencja
M1	WEK●EK●LKE HPELYKEKEI KpPKVTWKFp PETITIEGKE AEEY●KRQ
M2	WEK●EK●LKE HPELYKEKEI KpPKVTWKFp PETITIEGKE AEEY●KR N
M3	W Q K●EK●LKE HPELYKEKEI KpPK I T Y KFp PETITIEGKE AEEY●KRQ
M4	W Q K●EK● Q KE HPELYKEKEI KpPKVTWKFp PETITIEGKE AEEY●KRQ
M5	W Q K●EK●LKE HPE L Q KEKEI KpPKVTWKFp PETITIEGKE AEEY●KRQ
M6	W Q K●EK● L HE HPE W AKEKEI KpPKVTWKFp PETITIEGKE AEEY●KRQ
M7	WEK●EK● L YE HPE W HKEKEI KpPKVTWKFp PETITIEGKE AEEY●KRQ

● - *trans*-ACPC; p - D-prolina

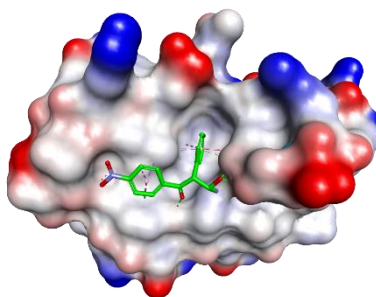


Rysunek 89. Modele minibiałek **M1-M7** z zaznaczonymi resztami aminokwasowymi, którymi różnią się od **M1**.

A



B



Rysunek 90. Model kompleksu produktu pośredniego (po związaniu obydwu substratów) i minibiałka **M3**.

3.4.2. Analiza strukturalna

Analiza strukturalna minibiałek obejmowała pomiary dichroizmu kołowego w stałej temperaturze oraz w zakresie temperatur 4-96°C dla wybranych długości fali (215 nm i 208 nm) oraz analizę metodą nanoDSF w zakresie temperatur 20-96 °C (rysunek 91).

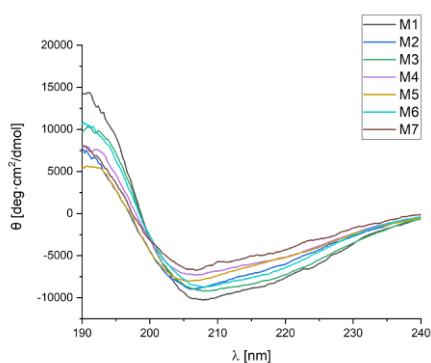
Wszystkie zarejestrowane widma CD wykazują szerokie sygnały w zakresie $\lambda = 205 \text{ nm} - 220 \text{ nm}$, których dokładne komponenty nie są jednoznacznie rozpoznawalne. Niemniej ten zakres długości fali obejmuje także minima spodziewane dla helis zawierających *trans*-ACPC (208 nm), α -helisy (208 nm i 222 nm) oraz β -kartkę (215-218 nm). Ze względu na złożoność struktury tych minibiałek przyjęto, że wyniki te są zgodne z oczekiwanymi. Krzywe temperaturowe wskazują na jednoczesne rozwijanie się elementów struktury drugorzędowej niemal wszystkich analogów, z wyjątkiem **M6** i **M7**, których stabilność strukturalna helis jest nieznacznie niższa. Wskazuje to na kooperatywność zwijania się, a więc obecność stabilizujących oddziaływań pomiędzy helisami i β -kartką. W większości przypadków nie dochodzi do całkowitego rozwinięcia w zakresie temperatur eksperymentu, przez co otrzymane wartości $T_{M, CD}$ są obarczone znacznym błędem.

Wyniki nanoDSF są bardziej zróżnicowane i ujawniają różnice między wariantami. Metoda ta jest czuła na lokalne zmiany w środowisku aromatycznych reszt, w szczególności tryptofanu. Sygnał zarejestrowany dla minibiałka **M5** spada, co może odpowiadać tendencji do agregacji w trakcie ogrzewania. Stosunek fluorescencji 350 nm / 330 nm jest najniższy dla **M1**, co może sugerować najlepiej upakowany rdzeń hydrofobowy. Wysoka wartość $T_{M, nanoDSF}$ 72,3 °C tego minibiałka potwierdza jego stabilność termiczną. Podobne wartości $T_{M, nanoDSF}$ przejawiają **M4**, **M6** i **M7**. Natomiast warianty **M2** i **M3** wykazują obniżoną stabilność termiczną. Szczególnie interesujący jest przypadek **M2**, w którym pojedyncza mutacja Q48N prowadzi do spadku stabilności. Skrócony łańcuch boczny tej reszty może utrudniać tworzenie się stabilizujących oddziaływań elektrostatycznych lub wiązań wodorowych, np. z pobliską Lys-18. W przypadku **M3** spadek stabilności można powiązać z mutacją W44Y, która zamienia dużą, hydrofobową resztę tryptofanu na mniejszą i bardziej polarną tyrozynę.

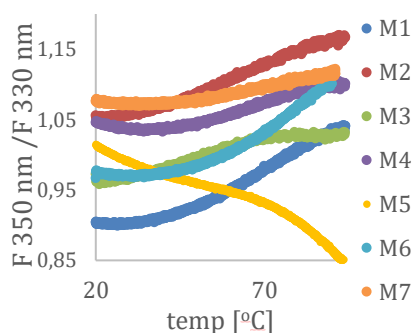
W przypadku pomiarów nanoDSF warto zwrócić uwagę na obecność tryptofanu w pozycji 1 we wszystkich wariantach minibiałka. Według modelu tryptofan powinien być zwrócony w kierunku hydrofobowego rdzenia. Pozycja ta może jednak być wyjątkowo dynamiczna lub częściowo wyeksponowana do rozpuszczalnika nawet w niskich temperaturach, wpływając na wyniki nanoDSF.

Porównanie wyników z obu metod sugeruje, że zaprojektowane minibiałka cechują się złożoną strukturą, która jest stabilna pod kątem struktury drugorzędowej, ale różnią się konformacją, na którą wpływają nawet pojedyncze mutacje w obrębie rdzenia i uczestniczące w stabilizujących sieciach oddziaływań. Warto zaznaczyć także wagę metody nanoDSF, której wyjątkowa czułość dopełnia obraz otrzymany metodą CD.

A

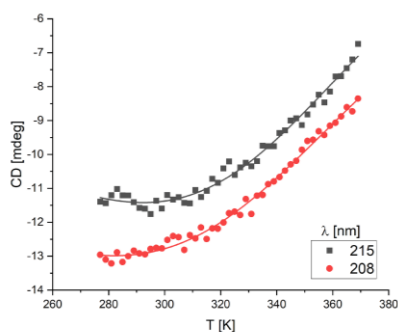


B

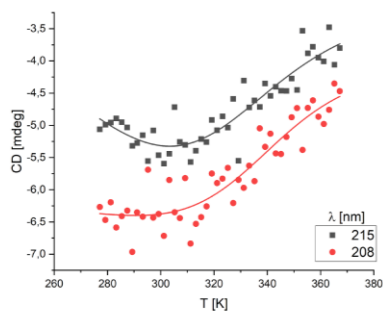


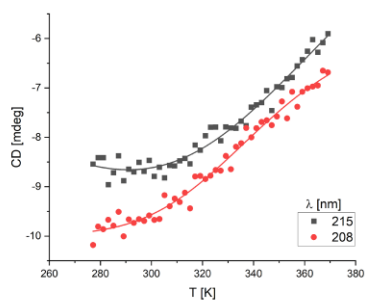
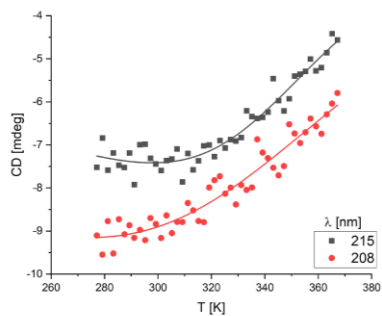
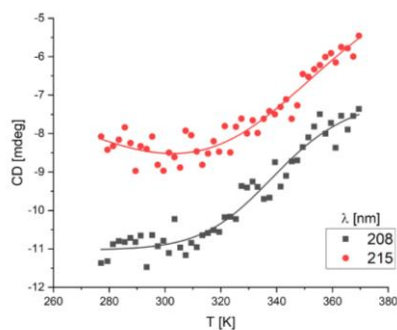
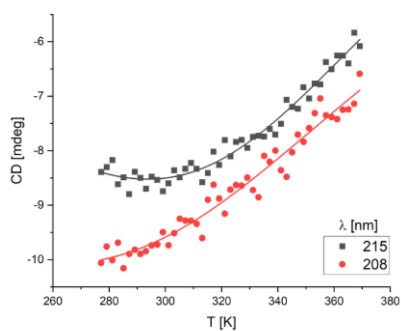
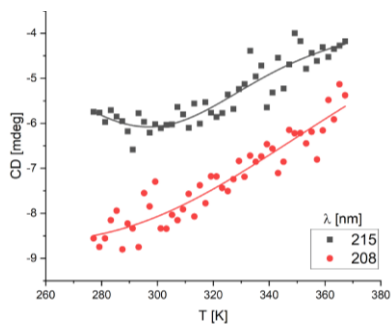
C

M1



M2



M3**M4****M5****M6****M7**

Rysunek 91. (A) Widma CD minibiałek wykonane w buforze fosforanowym o pH = 7. (B) Krzywe denaturacji temperaturowej minibiałek zmierzone przy pomocy techniki nanoDSF. (C) Krzywe denaturacji temperaturowej minibiałek dla wybranych długości fali.

Tabela 43. Porównanie wartości temperatur denaturacji temperaturowej minibiałek wyznaczonej przy użyciu dwóch metod.

Minibiałko	$T_{M,CD\ 208}$ [°C]	$T_{M,CD\ 215}$ [°C]	$T_{M,nanoDSF}$ [°C]
M1	>60	>60	72,9
M2**	~50	~50	32,7
M3**	~50	>60	45,6
M4**	>50	>60	68,4
M5**	68,1 ± 4,7	>60	Złe dopasowanie
M6	~50	>60	77,2
M7	>50	67,9 ± 3,3	63,2

** - peptydy zsyntetyzowane i oczyszczone przez Dr. Manisha Kumara z Katedry Chemii Bioorganicznej, Politechnika Wrocławska

3.4.3. Aktywność katalityczna

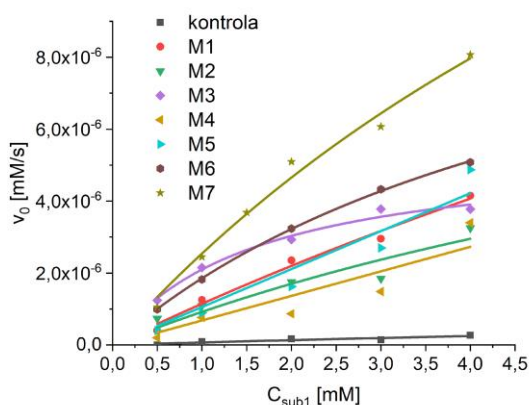
Aktywność katalityczną minibiałek **M1-M7** zmierzono po 1 godzinie reakcji prowadzonej w buforze fosforanowym o pH 7,4 (rysunek 92). Wariant **M7** wykazał najlepsze przyspieszenie reakcji (3622 ± 581), jednak brak wypłaszczenia krzywej kinetycznej sugeruje wysoką wartość K_M , a co za tym idzie, niską specyficzność minibiałka wobec substratów. Minibiałko **M3** charakteryzuje się wyjątkowo korzystną wartością K_M równą $1,6 \pm 0,3$ mM, jednak osiągnięte przyspieszenie reakcji wynosi jedynie 717 ± 68 (tabela 44).

Kontrast między efektywnością katalityczną a specyficznością wiązania substratu zaobserwowany dla wariantu **M7** sugeruje, że miejsce aktywne **M7** sprzyja obniżeniu bariery energetycznej reakcji, ale nie zapewnia precyzyjnego wiązania substratów. W tym przypadku obecność histydyny w pobliżu katalitycznej lizyny może być kluczowa. Może ona pełnić funkcję dodatkowego donora/akceptora protonów lub stabilizować stan przejściowy poprzez wpływ na lokalny rozkład ładunków.

Przeciwny efekt prezentowany jest przez wariant **M3**. Substrat reakcji wiązany jest skutecznie w obrębie wnęki, co może być spowodowane wpływem mutacji W27Y na geometrię miejsca aktywnego. Zmiana ta poprawia dopasowanie substratu, ale nie odpowiada optymalnemu układowi katalitycznemu. Obecność grupy hydroksylowej może także wprowadzać nowe oddziaływania z substratem lub stanem przejściowym, które nie są jednak wystarczająco ukierunkowane. Niewykluczone także, że tyrozyna ta

bierze bezpośredni udział w mechanizmie katalizy, jednak w porównaniu z **M7** mechanizm ten nie jest optymalny.

Co ciekawe, minibiątko **M3** jest też wariantem o obniżonej stabilności termicznej. Mniej upakowany rdzeń i większa elastyczność tego minibiątka mogą przekładać się na lepsze dopasowanie do substratu. Warianty o większym usztywnieniu struktury wykazują niższą aktywność. Ograniczenie dynamiki helis może zmniejszać zdolność miejsca aktywnego do reorganizacji przy kolejnych etapach reakcji.



Rysunek 92. Wykresy Michaelisa-Menten przy stałym stężeniu 4-nitrobenzaldehydu i rosnącym stężeniu fenyloacetaldehydu. Krzywe łączące punkty odpowiadają dopasowaniu do modelu Michaelisa-Menten, na podstawie którego wyznaczono parametry katalityczne.

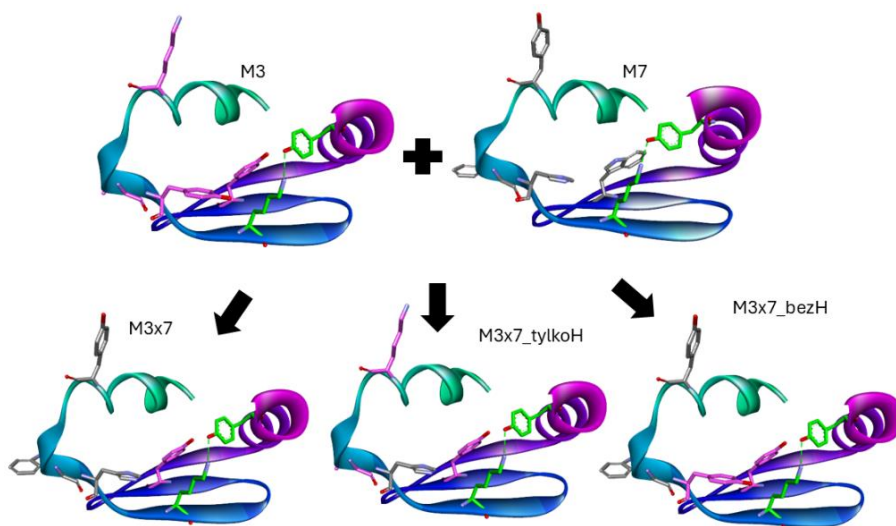
Tabela 44. Parametry katalityczne minibiątek obliczone na podstawie dopasowania do modelu Michaelisa-Menten.

Minibiątko	k_{cat}/k_{uncat}	K_M [mM]	$k_{cat}/K_M \cdot 10^5$ [s ⁻¹ ·mM ⁻¹]	$V_0 \cdot 10^6$ dla $C_{sub1}=3$ mM [mM·s ⁻¹]
M1	Złe dopasowanie			2,1
M2	1051 ± 116	4,0 ± 0,4	2,0 ± 0,2	1,0
M3	717 ± 68	1,6 ± 0,3	3,4 ± 0,6	3,2
M4	Złe dopasowanie			1,0
M5	Złe dopasowanie			2,3
M6	1481 ± 175	5,7 ± 0,4	2,0 ± 0,1	4,0
M7	Złe dopasowanie			5,9

3.4.4. Połączenie cech minibiałek o najlepszej charakterystyce

3.4.4.1. Projektowanie

W trakcie projektowania kolejnych analogów wzięto pod uwagę wysoką aktywność wykazaną przez analog o niskiej specyficzności, **M7**. Wariant ten różni się od **M3** mutacjami Q2E, K9Y, V25I, L14W, Y15H i Y27W. W celu sprawdzenia, czy połączenie cech obydwu minibiałek pozytywnie wpłynie na charakterystykę katalityczną, zaprojektowano i otrzymano trzy mutanty **M3x7**, **M3x7tylkoH** i **M3x7bezH** (rysunek 93). Ze względu na wyższą stabilność termiczną **M7**, ten wariant wybrano jako podstawę, do której wprowadzano wybrane mutacje odpowiadające **M3**.



Rysunek 93. Modele minibiałek łączących sekwencje **M3** i **M7**. Reszty katalityczne zaznaczono kolorem zielonym; mutacje, które pochodzą z sekwencji **M3** – kolorem różowym, a te, które pochodzą z **M7** – szarym.

Tabela 45. Sekwencje minibiałek o topologii HEEEH. Kolorem czerwonym zaznaczono reszty aminokwasowe charakterystyczne dla **M3**, a niebieskim – **M7**.

Minibiałko	Sekwencja
M3	WQK●EK●LKE HPELYKEKEI KpPKITYKFp PETITIEGKE AEEY●KRQ
M7	WEK●EK●LYE HPEW●HKEKEI KpPKVTWKFP PETITIEGKE AEEY●KRQ
M3x7	WEK●EK●LYE HPEW●HKEKEI KpPKVTYKFp PETITIEGKE AEEY●KRQ
M3x7_tylkoH	WEK●EK●LKE HPEL●HKEKEI KpPKVTYKFp PETITIEGKE AEEY●KRQ
M3x7_bezH	WEK●EK●LYE HPEWYKEKEI KpPKVTYKFp PETITIEGKE AEEY●KRQ

●-*trans*-ACPC; p-D-prolina

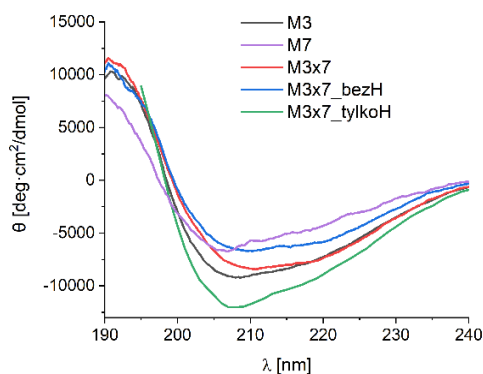
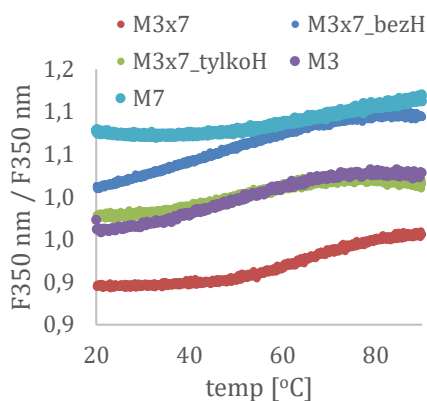
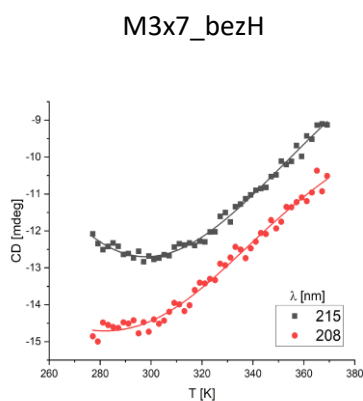
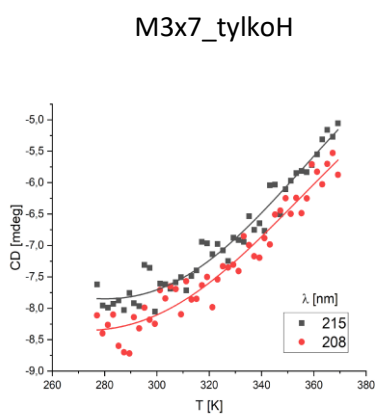
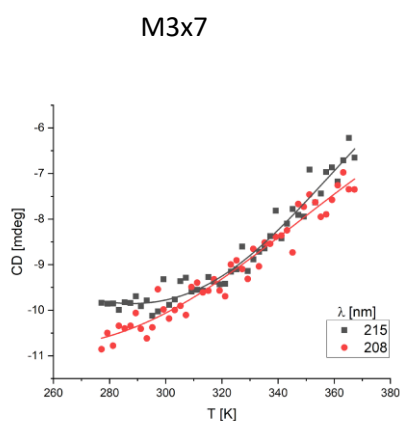
3.4.4.2. Analiza strukturalna

Widma dichroizmu kołowego wariantów **M3x7** i **M3x7_bezH**, zaprojektowanych na bazie sekwencji **M7** z wprowadzonymi wybranymi mutacjami charakterystycznymi dla **M3**, są do siebie zbliżone i charakteryzują się zbliżoną intensywnością sygnału dla długości fali 208, 215 i 222 nm (rysunek 94). Przebieg krzywej minibiałka **M3x7_tylkoH**, do którego wprowadzono największą liczbę mutacji obecnych w **M3**, przypomina natomiast widmo tego minibiałka z wyraźniejszym minimum odpowiadającym helikalnej strukturze zawierającej *trans*-ACPC. Wyniki te zdają się zgadzać z założeniami projektowymi, według których **M3x7_tylkoH** różni się od **M3** w mniejszym stopniu niż pozostałe warianty.

Krzywe denaturacji zmierzone metodą CD dla wybranych długości fali nie wskazują na istotne zmiany w obrębie stabilności termicznej struktur drugorzędowych, a wszystkie minibiałka wykazują jednocześnie rozwijanie się obu monitorowanych elementów strukturalnych.

Różnice w stabilności termicznej są natomiast widoczne na krzywych denaturacji uzyskanych metodą nanoDSF. Kształt krzywej otrzymanej dla **M3x7** jest zbliżony do **M7**, sigmoidalny z szerokim zakresem stabilności. Minibiałko to zawiera pojedynczą mutację z **M3**, Tyr-15. Wariant **M3x7_tylkoH** także charakteryzuje się sigmoidalnym przebiegiem krzywej, z widocznym punktem przegięcia w temperaturze ok. 50 °C; krzywa ta niemal całkowicie nakłada się na krzywą otrzymaną dla **M3**. Proces denaturacji minibiałka **M3x7_bezH**, zawierającego mutacje Tyr-27 i Tyr-15, wskazuje na marginalną stabilność termiczną i rozpoczyna się wraz z rozpoczęciem ogrzewania. Szacowana temperatura denaturacji dla tego wariantu $T_{M,nanoDSF}$ jest jednak zbliżona do **M3**.

Zestawienie tych danych wskazuje, że wprowadzenie reszty Tyr-27 jest destabilizujące, ale efekt ten może być skompensowany poprzez zachowanie pozostałych pozycji w sekwencji **M7** (**M3x7**). Najmniej stabilny analog zawiera zarówno Tyr-27, jak i Tyr-15 (**M3x7_bezH**). Dodatkowe mutacje Y9K i W14L upodabniają analog **M3x7_tylkoH** do **M3** pod kątem struktury drugorzędowej i właściwości termicznych. Uzyskane wyniki podkreślają, że wpływ poszczególnych mutacji zależy od ich kombinacji i kontekstu sekwencyjnego.

A**B****C**

Rysunek 94 (A) Widma CD minibiałek wykonane w buforze fosforanowym o pH = 7. (B) Krzywe denaturacji temperaturowej minibiałek zmierzone przy pomocy techniki nanoDSF. (C) Krzywe denaturacji temperaturowej minibiałek dla dwóch wybranych długości fali.

Tabela 46. Porównanie wartości temperatur denaturacji temperaturowej minibiałek wyznaczonej przy użyciu dwóch metod.

Minibiałko	$T_{M,CD\ 208}$ [°C]	$T_{M,CD\ 215}$ [°C]	$T_{M,nanoDSF}$ [°C]
M3	~50	>60	45
M7	>50	$67,9 \pm 3,3$	63
M3x7	>50	>50	65
M3x7_bezH	>60	>60	47
M3x7_tylkoH	>60	$69,2 \pm 2,8$	~50

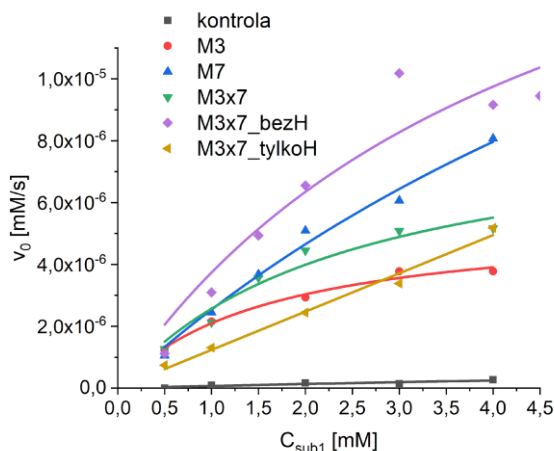
3.4.4.3. Aktywność katalityczna

Wprowadzenie tyrozyny w pozycji 27 zaowocowało otrzymaniem mutantu o charakterystyce katalitycznej pomiędzy wariantami **M3** a **M7**. Zaobserwowano przyspieszenie reakcji ok. 1081 oraz wartość K_M równą 2,7 mM (rysunek 95, tabela 47).

Co ciekawe, zastąpienie His-15 tyroziną występującą w **M3** (wariant **M3x7_bezH**) umożliwiło otrzymanie wyższej aktywności katalitycznej, jednak parametr K_M uległ znacznemu pogorszeniu. Warto zauważyć, że wariant ten jest najmniej stabilny konformacyjnie. Z kolei wariant **M3x7_tylkoH** wykazał pogorszenie obydwu parametrów kinetycznych.

Wyniki te sugerują, że histydyna nie jest głównym czynnikiem odpowiadającym za wysokie przyspieszenie reakcji osiągane przez **M7** i **M3x7**; kluczową rolę może natomiast odgrywać Tyr-9 lub kombinacja Tyr- 9 z Trp-14 (tabela 48). Według modelu strukturalnego reszta Tyr-9 nie powinna oddziaływać bezpośrednio z miejscem aktywnym, jednak może uczestniczyć w wiązaniu substratów lub w stabilizacji stanu przejściowego; Trp-14 może z kolei mieć efekt pośredni poprzez zmianę orientacji N-końcowej helisy.

Jednoczesny wzrost aktywności przy zachowaniu niskiego K_M , widoczny dla minibiałka **M3x7**, może oznaczać, że do otrzymania optymalnego układu katalitycznego konieczne jest traktowanie wybranych mutacji jako wzajemnie współgrających. Otrzymana K_M jest nieznacznie wyższa niż w przypadku **M3**, jednak w konsekwencji parametr k_{cat}/K_M pozostaje korzystniejszy dla wariantu **M3**.



Rysunek 95. Wykresy Michaelisa-Menten przy stałym stężeniu 4-nitrobenzaldehydu i rosnącym stężeniu fenyloacetaldehydu. Krzywe łączące punkty odpowiadają dopasowaniu do modelu Michaelisa-Menten, na podstawie którego wyznaczono parametry katalityczne.

Tabela 47. Parametry katalityczne minibialek obliczone na podstawie dopasowania do modelu Michaelisa-Menten.

Minibiałko	k_{cat}/k_{uncat}	K_M [mM]	$k_{cat}/K_M \cdot 10^5$ [s ⁻¹ ·mM ⁻¹]	$v_0 \cdot 10^6$ dla $C_{sub1}=3$ mM [mM·s ⁻¹]
M3	717 ± 68	1,6 ± 0,3	3,4 ± 0,6	3,2
M7	Złe dopasowanie			5,9
M3x7	1081 ± 96	2,7 ± 0,5	3,0 ± 0,5	4,1
M3x7_bezH	2581 ± 157	4,4 ± 2,6	4,6 ± 1,9	9,8
M3x7_tylkoH	Złe dopasowanie			3,0

Tabela 48. Porównanie minibialek M3x7, M3x7_tylkoH i M3x7_bezH.

minibiałko	mutacje	stabilność	przyspieszenie reakcji	specyficzność
M3x7	W27Y	jak M7	średnie	Średnia/wysoka
M3x7_tylkoH	W27Y, W14L, Y9K	jak M3	niskie	niska
M3x7_bezH	W27Y, H14Y	niska	wysokie	niska

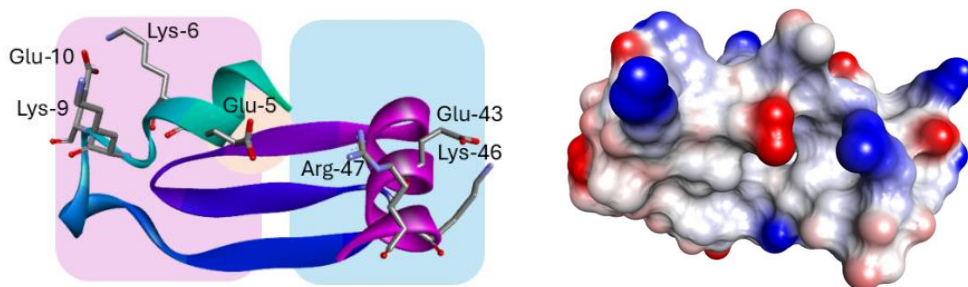
3.4.5. Optymalizacja rozkładu ładunków

3.4.5.1. Projektowanie

Rozkład ładunków na powierzchni białka przekłada się na pole elektrostatyczne oddziałujące na miejsce aktywne, którego wpływ na katalizę wykazano zarówno dla enzymów, jak i minibiałek katalitycznych, co omówiono także w poprzednich rozdziałach tej pracy. Ze względu na korzystniejszą wartość stałej wydajności katalitycznej minibiałko **M3** wybrano jako podstawę do doboru optymalnego momentu dipolowego.

W celu zbadania wpływu rozkładu ładunków elektrostatycznych na aktywność katalityczną minibiałka **M3** podzielono je na dwie części. W obrębie każdej z nich zidentyfikowano naładowane reszty aminokwasowe i wybrano te, które będą poddawane mutacjom (rysunek 96). Wybór był kierowany minimalizacją wpływu na stabilność strukturalną minibiałka i położenie poza rdzeniem hydrofobowym. Reszty te modyfikowano tak, żeby zmienić ładunek wypadkowy danej części minibiałka.

Część I obejmowała pozycje Lys-6, Lys-9 i Glu-10 w obrębie N-końcowej helisy, a część II Glu-43, Lys-46 i Arg-47 w obrębie C-końcowej helisy. Glu-5 wybrano jako dodatkowy punkt mutacji, ze względu na jego bliskość do miejsca aktywnego.



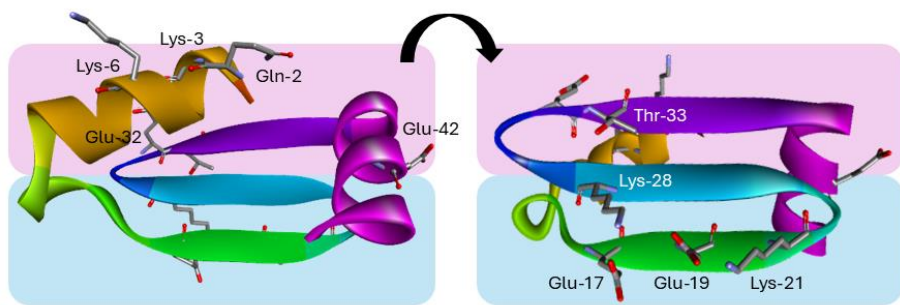
Rysunek 96. Pierwszy podział minibiałka **M3** na części: część I – kolor różowy, pozycja 5 – pomarańczowy, część II – niebieski. Po prawej stronie pokazano powierzchnię **M3** pokolorowaną zgodnie z interpolowanym rozkładem ładunków.

Tabela 49. Sekwencje analogów **M3**. W celu porównania z wyjściową sekwencją zawarto także sekwencję minibiałka **M3**. Kolory wyróżnienia tekstu odpowiadają części, do której przypadają: zielony – część I, różowy – część II, niebieski – pozycja 5.

Minibiałko	Część I/pozycja 5/część II	Sekwencja
M3		WQK●EK●LKE HPELYKEKEI KpPKITYKFp PETITIEGKE AEEY●KRQ
M3.1	+/H/-	WQK●HK●LKQ HPELYKEKEI KpPKITYKFp PETITIEGKE AEEY●QEQ
M3.2	+/Q/0	WQK●QK●LKQ HPELYKEKEI KpPKITYKFp PETITIEGKE AEEY●KRQ
M3.3	+/Q/-	WQK●QK●LKQ HPELYKEKEI KpPKITYKFp PETITIEGKE AEEY●QEQ
M3.4	-/E/+	WQK●EQ●LEE HPELYKEKEI KpPKITYKFp PETITIEGKE AEQY●KRQ
M3.5	-/Q/+	WQK●QE●LEE HPELYKEKEI KpPKITYKFp PETITIEGKE AEQY●KRQ
M3.6	+/E/0	WQK●EK●LKR HPELYKEKEI KpPKITYKFp PETITIEGKE AEEY●KRQ

● - *trans*-ACPC; p - D-prolina

Drugi podział minibiałka objął także reszty aminokwasowe wchodzące w skład β-kartki. W przypadku części I brano pod uwagę Gln-2, Lys-3, Lys-6, Glu-32, Glu-42, Glu-39 i Thr-33. W ramach części II modulowano ładunkiem Lys-28, Glu-17, Glu-19, Lys-21 (rysunek 97).



Rysunek 97. Drugi podział minibiałka **M3** na części: część I – kolor różowy, część II – kolor niebieski.

Tabela 50. Sekwencje analogów **M3**. W celu porównania z wyjściową sekwencją zawarto także sekwencję minibiałka **M3**. Kolory wyróżnienia tekstu odpowiadają części, do której przypadają (zielony – cz. I; żółty – cz. II)

Minibiałko	Część I/II	Sekwencja
M3		WQK●EK●LKE HPELYKEKEI KpPKITYKFp PETITIEGKE AEEY●KRQ
M3.7	+/-	WRK●EK●LKE HPELYKEKEI QpPKITYQFp PQRITIEGKE AHEY●KRQ
M3.8	-/+	WEH●EQ●LKE HPELYKQKQI KpPKITYKFp PETITIEGKE AHEY●KRQ

M3.9	+/0	WRK◆EK◆LKE HP ELYKEKEI KpPKITYKFp PHRITIEGKH AFEY◆KRQ
M3.10	0/0	WRK◆EK◆LKE HP ELYKEKQI KpPKITYQFp PQTITIEGKH AFEY◆KRQ

◆-*trans*-ACPC; p-D-prolina

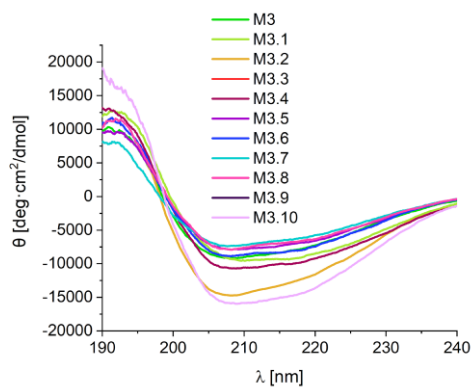
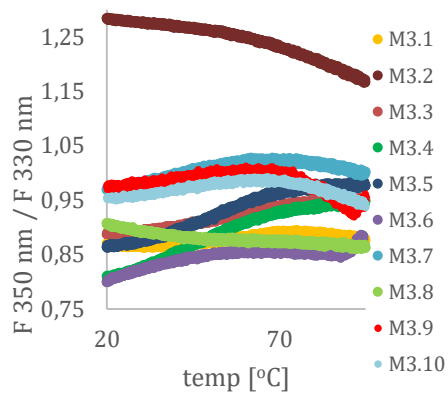
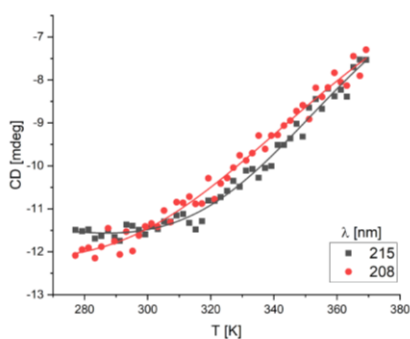
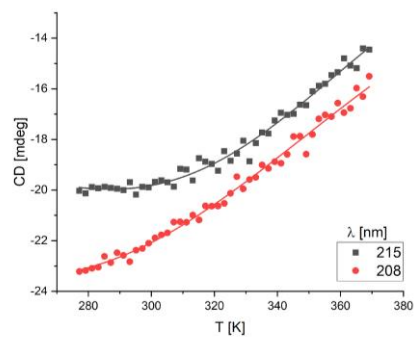
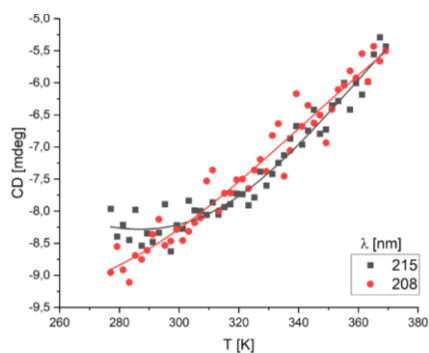
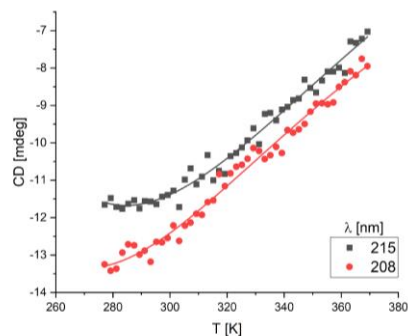
3.4.5.2. Analiza strukturalna

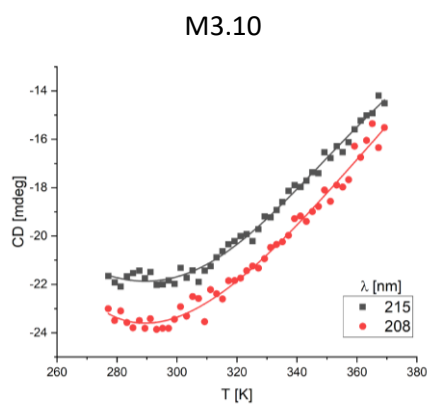
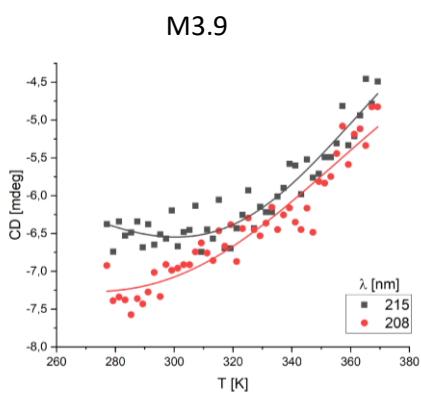
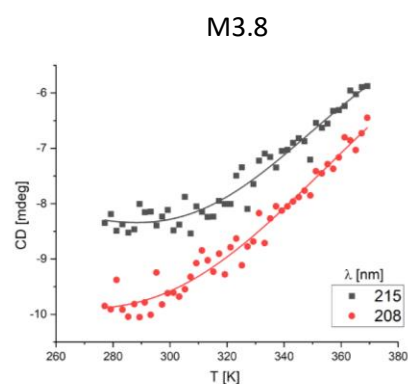
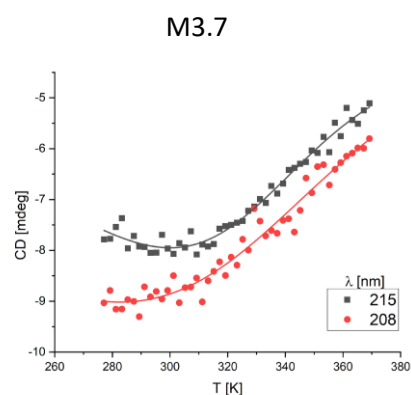
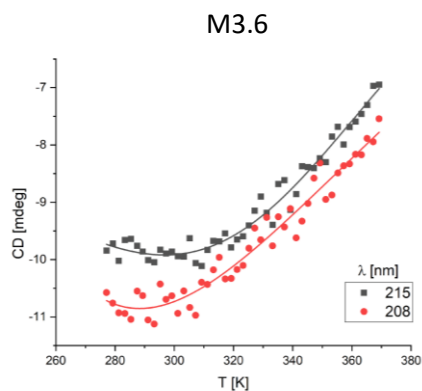
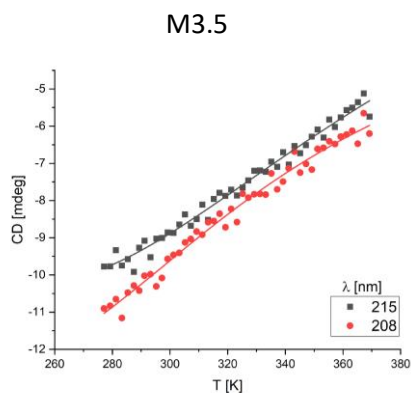
Brak zmian w kształcie widm CD po mutacji rozkładu ładunków na powierzchni minibiłka **M3** wskazuje, że mutacje te nie zaburzają architektury drugorzędowej (rysunek 98). Warianty **M3.2** i **M3.3** wykazują nieznacznie obniżoną stabilność termiczną helis, a **M3.5** – brak zakresu stabilności dla elementów struktury drugorzędowej. Analogicznie do wariantu **M3**, jego pochodne także nie ulegają całkowitemu rozwinięciu w badanym zakresie temperatur. Sugeruje to, że część minibiłka zachowuje zwiniętą konformację.

Analiza nanoDSF potwierdza, że większość wariantów nie uległa zmianom konformacyjnym. Punkt przegięcia w okolicy 40-45 °C dla **M3.3**, **M3.4** i **M3.5** odpowiada wartości otrzymanej dla **M3**. Nieznaczne obniżenie stabilności **M3.7**, **M3.10** i **M3.9** może wskazywać na umiarkowany efekt osłabienia lokalnych oddziaływań.

Warianty **M3.1**, **M3.6** i **M3.8** nie wykazują wyraźnych zmian sygnału w trakcie całego pomiaru. Interpretacja takiego przebiegu krzywych jest niejednoznaczna. Może oznaczać wyższą stabilność temperaturową, zbyt małe wzbudzenie lub rozwinięcie częściowe, które nie obejmuje środowiska tryptofanu.

Wysoki sygnał otrzymany dla **M3.2** może wskazywać na znaczne rozwinięcie struktury lub wyeksponowanie tryptofanu do rozpuszczalnika. Biorąc pod uwagę, że jedynym tryptofanem w tej sekwencji jest Trp-1, nie jest to nieprawdopodobne. Mutacje wprowadzone do **M3.2** nie powinny mieć tak negatywnego efektu, ponieważ powtarzają się one także w pozostałych wariantach.

A**B****C****M3.1****M3.2****M3.3****M3.4**



Rysunek 98. (A) Widma CD minibiadek wykonane w buforze fosforanowym o pH = 7. (B) Krzywe denaturacji temperaturowej minibiadek zmierzone przy pomocy techniki nanoDSF. (C) Krzywe denaturacji temperaturowej minibiadek dla dwóch wybranych długości fali.

Tabela 51. Porównanie wartości temperatur denaturacji temperaturowej minibiałek wyznaczonej przy użyciu dwóch metod.

Minibiałko	$T_{M,CD\ 208}$ [°C]	$T_{M,CD\ 215}$ [°C]	$T_{M,nanoDSF}$ [°C]
M3.1	>50	80,6 ± 8,2	59,8
M3.2	Brak punktu przegięcia	>60	brak punktu przegięcia
M3.3	Brak punktu przegięcia	>60	48,0
M3.4	Brak punktu przegięcia	>60	42,8
M3.5	Brak punktu przegięcia	Brak punktu przegięcia	51,5
M3.6	>60	>60	brak punktu przegięcia
M3.7	>60	62,7 ± 4,4	36,4
M3.8	>60	74,7 ± 15,0	~40
M3.9	>60	>60	~40
M3.10	>60	67,4 ± 9,3	~40

3.4.5.3. Aktywność katalityczna

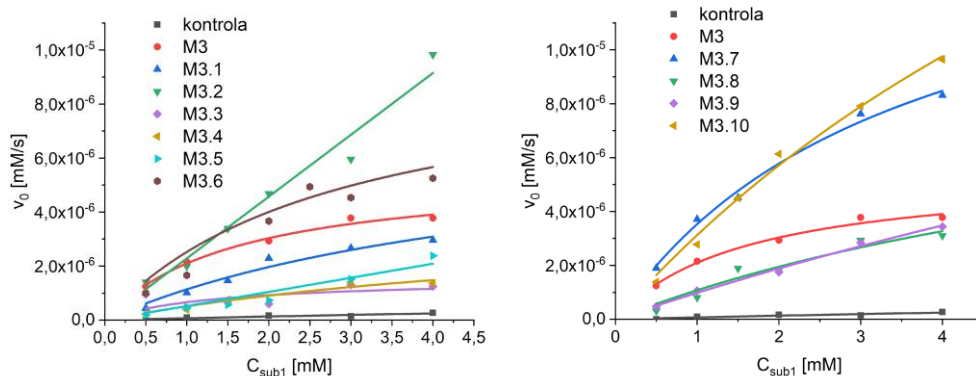
W porównaniu z minibiałkiem **M3**, poprawioną charakterystykę katalityczną zaobserwowano dla wariantów **M3.6**, **M3.2**, **M3.10** i **M3.7**, co wskazuje, że modulacja rozkładu ładunków może skutecznie wpływać na aktywność katalityczną (rysunek 99, tabela 52). Minibiałka **M3.2** i **M3.10** charakteryzują się wzrostem wartości K_M , a więc obniżoną specyficznością wobec substratów. Warto przypomnieć, że **M3.2** jest również minibiałkiem o najniższej stabilności termicznej. Możliwe, że aktywność katalityczna tego wariantu jest powiązana z jego dynamiką.

Najlepsze wyniki otrzymano dla wariantów **M3.6** i **M3.7**, o przyspieszeniach reakcji ok. 1200 i 2000. W obu przypadkach poprawa efektywności katalitycznej koreluje ze wzrostem dodatniego ładunku minibiałka. Wariant **M3.6** zawiera pojedynczą mutację E→R, natomiast w **M3.7** wprowadzono kilka dodatnio naładowanych reszt przy jednoczesnym usunięciu negatywnych. Analogiczny efekt można odnieść do wariantów **M3.2** i **M3.10**, w których dwie reszty glutaminianu zastąpiono glutaminami. Eliminacja negatywnie naładowanych reszt zdaje się zwiększać k_{cat} reakcji, ale kosztem oddziaływań

z substratem. Wyjątkiem wydaje się być wariant **M3.9**, którego efektywność spadała pomimo wprowadzenia dodatnie naładowanych reszt. Przyczyną może być His-32 lub His-40, które nie występują w żadnym innym analogu, a mogą naruszać oddziaływania między strukturami drugorzędowymi. W rezultacie mogą one doprowadzić do ich przesunięcia i zmian geometrii miejsca aktywnego.

Spadek efektywności katalitycznej dotyczył także wszystkich pozostałych mutantów. Wprowadzenie większej liczby negatywnych ładunków nie sprzyja katalizie, co zaobserwowano w przypadku **M3.3**, **M3.4**, **M3.5**, **M3.8**. Obecność negatywnie naładowanych reszt w tym regionie może zaburzać korzystne oddziaływania elektrostatyczne w obrębie miejsca aktywnego lub zmieniać orientację katalitycznej lizyny.

Na podstawie tych danych można wysunąć hipotezę, że dodatnie ładunki zgromadzone w okolicy miejsca aktywnego pozytywnie wpływają na przebieg reakcji. Efekt ten może być związany ze stabilizowaniem ładunków stanu przejściowego lub z obniżeniem efektywnego pK_a katalitycznej lizyny, które obserwowano w peptydach bogatych w ten aminokwas.



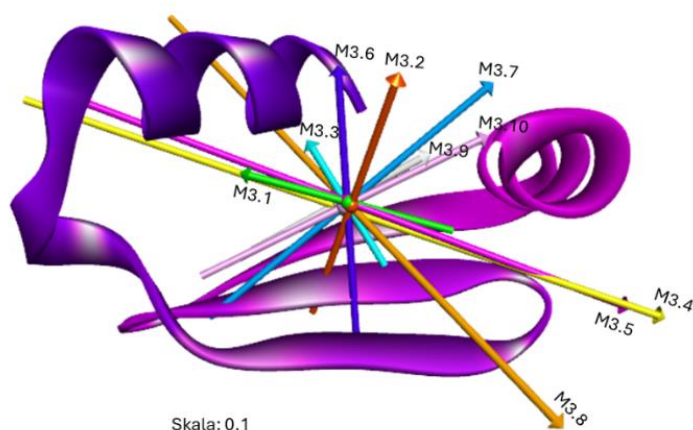
Rysunek 99. Wykresy Michaelisa-Menten przy stałym stężeniu 4-nitrobenzaldehydu i rosnącym stężeniu fenyloacetaldehydu. Krzywe łączące punkty odpowiadają dopasowaniu do modelu Michaelisa-Menten, na podstawie którego wyznaczono parametry katalityczne.

Tabela 52. Parametry katalityczne minibiałek obliczone na podstawie dopasowania do modelu Michaelisa-Menten.

Minibiałko	k_{cat}/k_{uncat}	K_M [mM]	$k_{cat}/K_M \cdot 10^5$ [s ⁻¹ ·mM ⁻¹]	$v_0 \cdot 10^6$ dla $C_{sub1}=3$ mM [mM·s ⁻¹]
M3	717 ± 68	1,6 ± 0,3	3,4 ± 0,6	3,2
M3.1	945 ± 148	5,3 ± 2,6	1,4 ± 0,7	2,1
M3.2	Złe dopasowanie			5,9
M3.3	202 ± 74	1,3 ± 1,8	1,2 ± 1,6	1,0
M3.4	Złe dopasowanie			1,1
M3.5	Złe dopasowanie			2,2
M3.6	1270 ± 269	2,8 ± 2,0	3,4 ± 2,4	5,3
M3.7	2083 ± 123	3,5 ± 0,7	4,5 ± 0,8	7,6
M3.8	Złe dopasowanie			2,1
M3.9	Złe dopasowanie			2,1
M3.10	3119 ± 10	6,3 ± 1,6	3,8 ± 1,0	7,9

Zmiany w rozkładzie ładunków minibiałek przekładają się na wypadkowy moment dipolowy wyznaczony względem centrum geometrii. Ponieważ centrum jest zbliżone do pozycji grupy NH₂ katalitycznej lizyny, można przyjąć, że podobny moment dipolowy wywierany jest na miejsce aktywne.

Wariantom o lepszej charakterystyce katalitycznej odpowiadają momenty dipolowe skierowane wzdłuż osi łańcucha bocznego lizyny, w kierunku od powierzchni β-kartki, skierowane w kierunku C-końcowej helisy. Przy założeniu, że pole katalityczne odpowiada za poprawę efektywności katalitycznej tych wariantów, można wskazać jego optymalny rozkład (rysunek 100).

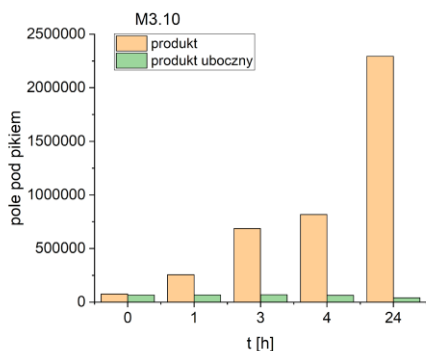


Rysunek 100. Wektory momentu dipolowego obliczone względem środka geometrycznego minibiałka.

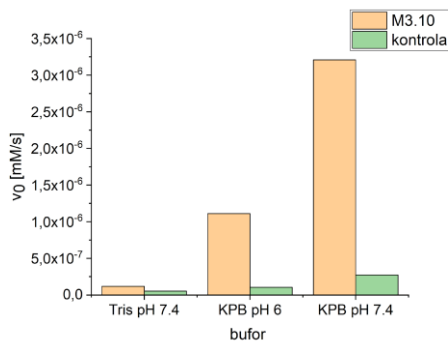
Dla wariantu **M3.10** wykonano dodatkowe pomiary mające na celu głębsze zrozumienie katalizowanej reakcji. Podczas pomiarów aktywności katalitycznej obserwuje się dodatkowy sygnał, odpowiadający produktowi kondensacji fenyloacetaldehydu ze sobą. Wykres przedstawiony na rysunku 101 pokazuje, że od momentu rozpoczęcia katalizy ilość tego produktu się nie zmienia, podczas gdy powstaje coraz więcej produktu głównego (nienasyconego). Oznacza to, że fenyloacetaldehyd ma powinowactwo do enzymu i preferowane jest tworzenie iminy z katalityczną lizyną. Dodatkowo zmierzono v_0 tego wariantu w warunkach pH 6 i w buforze Tris. Zarówno zmiana soli, jak i obniżenie pH powodują znaczne obniżenie aktywności katalitycznej. W środowisku o pH 6 obniżenie aktywności wynika prawdopodobnie z protonacji katalitycznej lizyny, co drastycznie zmniejsza jej nukleofilowość i utrudnia formowanie zasady Schiffa. Z kolei efekt hamujący buforu Tris może wiązać się z konkurencyjną reakcją jego grupy aminowej z substratem aldehydowym.

Zbadano także wpływ niewielkich perturbacji warunków reakcji na aktywność tego minibiałka (rysunek 102). Ze względu na sekwencyjną naturę mechanizmu, wymagającą wiązania fenyloacetaldehydu przez 4-nitrobenzaldehydem, zweryfikowano efekt wstępnej inkubacji peptydu z pierwszym substratem. Zaobserwowano, że 15-minutowa inkubacja skutkuje 1,8-krotnym wzrostem v_0 . Dalsze wydłużenie tego procesu nie jest korzystane. Dodatkowo podniesienie temperatury z 25 do 30 °C spowodowało umiarkowany wzrost aktywności.

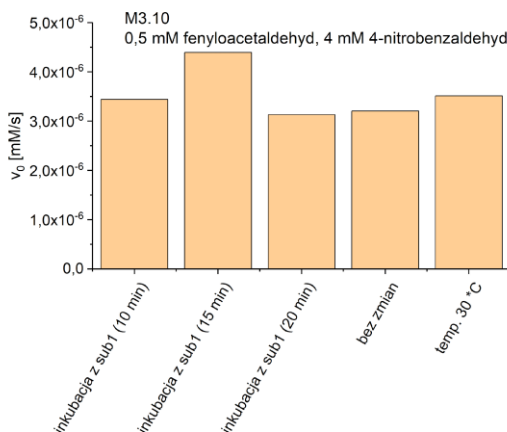
A



B



Rysunek 101. (A) Zmiany pola pod sygnałem odpowiadającym produktowi nienasyconemu katalizy oraz produktowi ubocznemu w czasie. Dane otrzymano dla reakcji z 0,1 mM minibiałkiem **M3.10**, 4 mM 4-nitrobenzaldehydem i 0,5 mM fenyloacetaldehydem. (B) Początkowa szybkość reakcji w 50 mM buforze fosforanowym o pH 7,4 lub 6,0 oraz 50 mM buforze Tris o pH 7,4.



Rysunek 102. Początkowa szybkość reakcji katalizowanej przez **M3.10** dla 0,5 mM fenyloacetaldehydu i 4 mM 4-nitrobenzaldehydu, w buforze 50 mM KPB. Próbkę różni się czasem inkubacji peptydu z substratem sub1 lub temperaturą.

3.4.6. Dodatkowe mutacje w pierwszej i drugiej sferze koordynacji

3.4.6.1. Projektowanie

Podczas gdy wprowadzenie korzystnego rozkładu ładunków na powierzchni minibiałka doprowadziło do zwiększenia przyspieszenia reakcji, doszło do jednoczesnego spadku specyficzności. Sugeruje to, że nowo powstałe sieci oddziaływań elektrostatycznych mogą wpływać na ułożenie reszt w obrębie wnęki katalitycznej lub wyeliminowano grupy funkcyjne, które odpowiadały za wiązanie substratów. Ze względu

na możliwość uzyskania lepszej charakterystyki kinetycznej, zdecydowano się na kolejną iterację optymalizacji reszt w pobliżu katalitycznej lizyny.

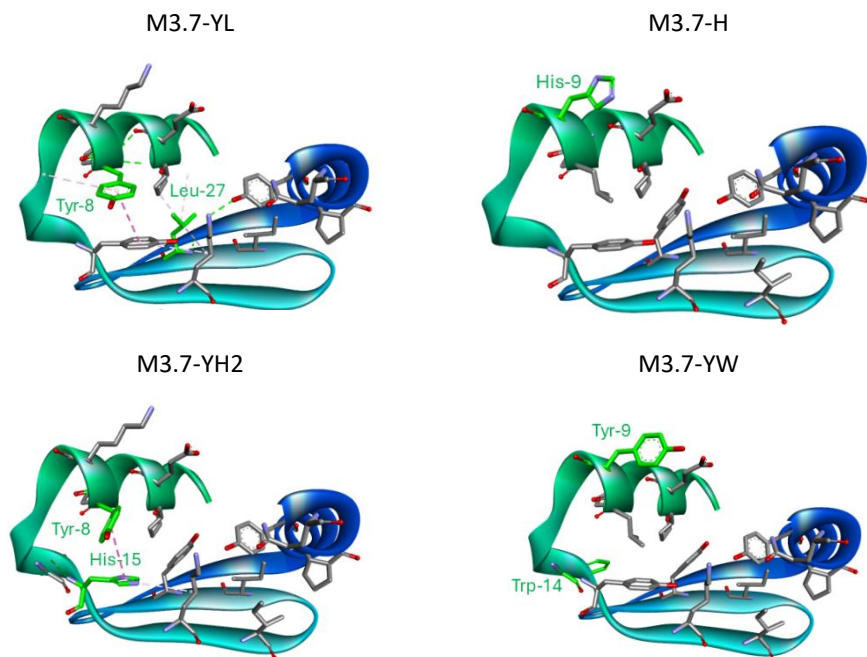
Zaprojektowano cztery sekwencje, których założenia projektowe można podzielić na dwa typy. W pierwszym przypadku, dotyczącym minibiałek **M3.7-YW** oraz **M3.7-H**, powrócono do poprzednio omawianego pomysłu modyfikacji reszty aminokwasowej w pozycji 9, której znaczenie zauważono dla wariantów **M3x7** i **M3x7_bezH**. Sekwencja **M3x7-YW** jest bezpośrednio inspirowana analogiem **M3x7_bezH** i zawiera mutacje K9Y oraz L14W. W przypadku minibiałka **M3.7-H** Lys-9 zastąpiono histydyną (rysunek 103)

Zmiany wprowadzone do dwóch pozostałych projektów obejmują reszty znajdujące się w najbliższym sąsiedztwie miejsca aktywnego. Zamiana pozycjami reszty Tyr-27 i Leu-8, która dotyczy sekwencji **M3.7-YL**, ma na celu zmianę kształtu wnęki, a potencjalnie także przeorganizowanie miejsca aktywnego. Podobne znaczenie mają mutacje obecne w wariantcie **M3.7-YH2**, w którym wprowadzono L8Y oraz Y15H (rysunek 103-104). W rezultacie w obydwu mutantach w pobliżu miejsca aktywnego pozostają trzy tyrozyny, jednak w różnych konfiguracjach.

Tabela 53. Sekwencje analogów **M3.7**. W celu porównania z wyjściową sekwencją zawarto także sekwencję minibiałka **M3.7**.

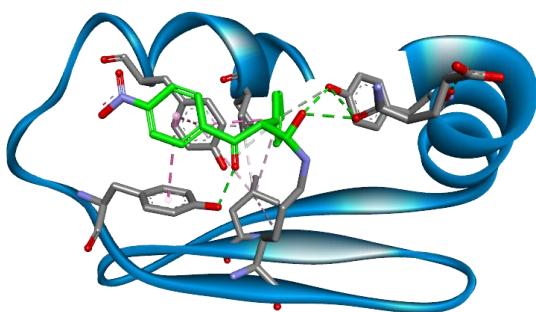
Minibiałko	Sekwencja
M3.7	WRK●EK●LKE HPELYKEKEI QpPKITYQFp PQRITIEGKE AHEY●KRQ
M3.7-YL	WRK●EK●YKE HPELYKEKEI QpPKITYLFp PQRITIEGKE AHEY●KRQ
M3.7-H	WRK●EK●LHE HPELYKEKEI QpPKITYQFp PQRITIEGKE AHEY●KRQ
M3.7-YH2	WRK●EK●YKE HPELHKEKEI QpPKITYQFp PQRITIEGKE AHEY●KRQ
M3.7-YW	WRK●EK●LYE HPEWYKEKEI QpPKITYQFp PQRITIEGKE AHEY●KRQ

● - *trans*-ACPC; p-D-prolina

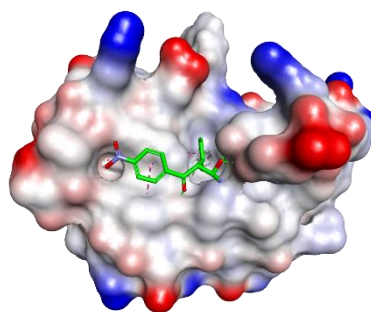


Rysunek 103. Modele minibiałek z zaznaczonymi na zielono resztami, które zostały wprowadzone do sekwencji.

A



B



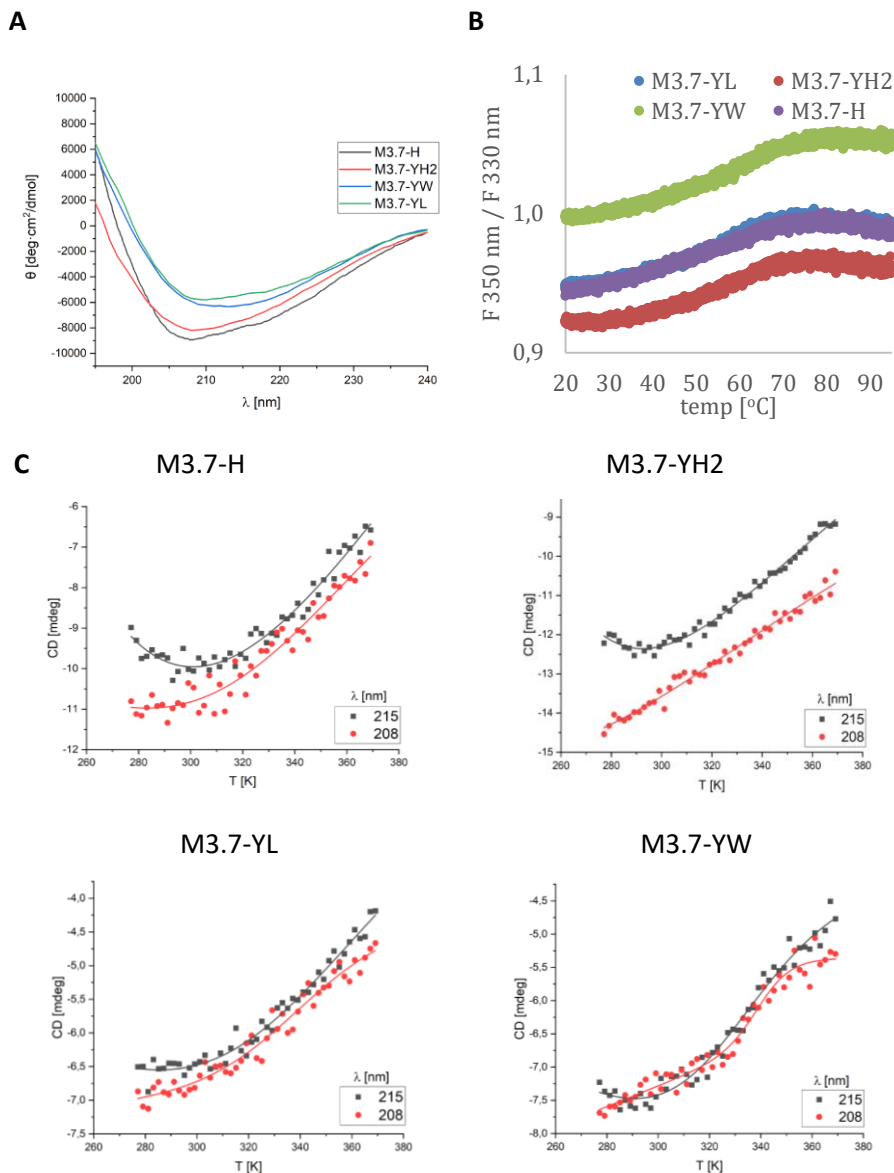
Rysunek 104. Model kompleksu produktu pośredniego i minibiałka **M3.7-YL**. Reszta Tyr-8 może przyjmować dwie alternatywne pozycje. (A) Reprezentacja wstążkowa z zaznaczonymi resztami w centrum aktywnym i związanym produktem przejściowym. Przerywanymi liniami zaznaczone są oddziaływania niekowalencyjne. (B) Dopasowanie produktu przejściowego do powierzchni minibiałka **M3.7-YL**.

3.4.6.2. Analiza strukturalna

Charakterystyczne zrównanie się minimów na widmie CD zaobserwowane dla minibiałka **M3.7-YW** zarejestrowano wcześniej dla **M3x7** i **M3x7_bezH**, wariantów, które także zawierają resztę Trp-14. Z kolei krzywa CD minibiałka **M3.7-YH2** zawiera dodatkowe minimum ok. 195 nm, co sugeruje częściowe rozwinięcie struktury. Krzywe

temperaturowe także wskazują na osłabioną stabilność heliakalnego fragmentu tego minibiłka. Pozostałe warianty nie demonstrowują znacznych zmian zauważalnych metodą CD (rysunek 105).

Krzywe temperaturowe mierzone metodą nanoDSF są niemal identyczne dla wszystkich mutantów, a ich $T_{M,nanoDSF}$ wynosi 50-60°C.



Rysunek 105. (A) Widma CD minibiłek wykonane w buforze fosforanowym o pH = 7. (B) Krzywe denaturacji temperaturowej minibiłek zmierzone przy pomocy techniki nanoDSF. (C) Krzywe denaturacji temperaturowej minibiłek dla dwóch wybranych długości fali.

Tabela 54. Porównanie wartości temperatur denaturacji temperaturowej minibiałek wyznaczonej przy użyciu dwóch metod.

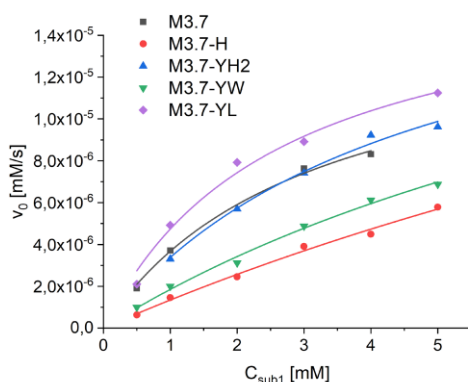
Minibiałko	$T_{M,CD\ 208}$ [°C]	$T_{M,CD\ 215}$ [°C]	$T_{M,nanoDSF}$ [°C]
M3.7-H	70,6 ± 6,9	64,7 ± 3,6	60,2
M3.7-YH2	Złe dopasowanie	Złe dopasowanie	61,1
M3.7-YW	67,6 ± 2,0	59,2 ± 6,3	62,3
M3.7-YL	72,9 ± 9,6	Złe dopasowanie	59,0

3.3.6.3. Aktywność katalityczna

Druga iteracja optymalizacji otoczenia miejsca aktywnego doprowadziła do poprawy parametrów kinetycznych jednego wariantu — **M3.7-YL**. Uzyskano przyspieszenie reakcji ok. 2300 i stałą Michaelisa ok. 2,6 mM (rysunek 106, tabela 55). Choć wcześniej zakładano, że Tyr-27 ma kluczową rolę w katalizie, uzyskane wyniki sugerują, że przeniesienie tej reszty na pozycję 8 prowadzi do korzystniejszej organizacji miejsca aktywnego. Obniżona wartość K_M oznacza, że zmieniony kształt wnęki katalitycznej skutkuje lepszym dopasowaniem substratu, chociaż nie aż tak silnym jak w przypadku **M3**.

Dwa badane minibiałka wykazały liniową zależność szybkości reakcji od stężenia substratu i znaczne obniżenie aktywności katalitycznej. W przypadku wariantu **M3.7-YH2** krzywa Michaelisa-Menten pozostała zgodna z **M3.7** – wprowadzone modyfikacje nie wpłynęły na katalizę albo ich efekty się kompensują.

Wspólną cechą wariantów o obniżonej aktywności jest obecność mutacji w pozycji 9; zarówno wprowadzenie tyrozyny (**M3.7-YW**), jak i histydyny (**M3.7-H**) prowadzi do pogorszenia parametrów (tabela 56). Jest to wyjątkowo ciekawe, ponieważ kombinację mutacji K9Y z L14W (**M3.7-YW**) uznano wcześniej za korzystną w minibiałkach **M3x7** i **M3x7_bezH**. Wynik ten jest kolejnym sygnałem, że efekt mutacji nie jest addytywny i silnie zależy od kontekstu strukturalnego. Wprowadzenie mutacji na tym etapie może zaburzać poprzednio zoptymalizowany rozkład ładunków – w tym przypadku poprzez eliminację reszty lizyny. Dodatkowo mutacje mogą wpływać na preorganizację miejsca aktywnego poprzez naruszenie istniejącej sieci oddziaływań, a w przypadku wprowadzenia Trp-14 może wpływać na dynamikę minibiałka.



Rysunek 106. Wykresy Michaelisa-Menten przy stałym stężeniu 4-nitrobenzaldehydu i rosnącym stężeniu fenyloacetaldehydu. Krzywe łączące punkty odpowiadają dopasowaniu do modelu Michaelisa-Menten, na podstawie którego wyznaczono parametry katalityczne.

Tabela 55. Parametry katalityczne minibialek obliczone na podstawie dopasowania do modelu Michaelisa-Menten.

Minibiałko	k_{cat}/k_{uncat}	K_M [mM]	$k_{cat}/K_M \cdot 10^5$ [s ⁻¹ ·mM ⁻¹]	$v_0 \cdot 10^6$ dla $C_{sub1}=3$ mM [mM·s ⁻¹]
M3.7	2083 ± 123	3,5 ± 0,7	4,5 ± 0,8	7,6
M3.7-H	Złe dopasowanie			3,2
M3.7-YH2	2490 ± 137	4,6 ± 0,9	4,1 ± 0,8	7,6
M3.7-YW	Złe dopasowanie			4,1
M3.7-YL	2364 ± 12	2,6 ± 0,6	6,8 ± 2,5	9,0

Tabela 56. Porównanie minibialek M3.7-H, M3.7-YH2, M3.7-YW i M3.7-YL.

minibiałko	mutacje	stabilność	aktywność	specyficzność
M3.7-H	K9H	wysoka	słaba	słaba
M3.7-YH2	Y15H, L8Y	średnia	średnia	średnia
M3.7-YW	K9Y, L14W	wysoka	słaba	słaba
M3.7-YL	Y27L, L8Y	wysoka	wysoka	wysoka

3.3.7. Podsumowanie

Trzeci zestaw minibiałek obejmował 24 peptydy zaprojektowane *de novo* metodami obliczeniowymi, które następnie zsyntetyzowano, oczyszczono oraz scharakteryzowano. Analizę strukturalną przeprowadzano na podstawie widm CD oraz zmian fluorescencji reszty tryptofanu (metodą nanoDSF). Wyłoniono co najmniej 6 minibiałek o wysokiej stabilności termicznej (T_M z obydwu metod > 60 °C). Warto odnotować, że ze względu na brak pełnego rozwinięcia struktur drugorzędowych w trakcie pomiaru, dokładne określenie T_M metodą CD było utrudnione dla wielu badanych peptydów.

Analiza aktywności katalitycznej wykazała istnienie kompromisu pomiędzy specyficznością a aktywnością badanych związków. Zaobserwowano także istotny wpływ momentu dipolowego struktury na aktywność, co najprawdopodobniej wynika z obniżenia pK_a katalitycznej lizyny lub z działania wytworzonego pola katalitycznego.

Interesujących wniosków dostarczyło także porównanie skutków wprowadzenia tych samych mutacji na różnych etapach optymalizacji sekwencji. Choć mutacje powinny być wprowadzane stopniowo, wykazano, że niektóre z nich działają synergistycznie (w grupach), a ich finalny wpływ na katalizę zależy od kontekstu strukturalnego (otoczenia aminokwasowego).

Najaktywniejsze katalityczne minibiałka z tej serii osiągnęły k_{cat}/k_{uncat} rzędu 2500-3000 (warianty **M3.10**, **M3.7-YL**) i k_{cat}/K_M $6,8 \pm 2,5 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1} \cdot \text{mM}^{-1}$. Są to wartości zbliżone do tych osiągniętych dla minibiałek o topologii HHEEE.

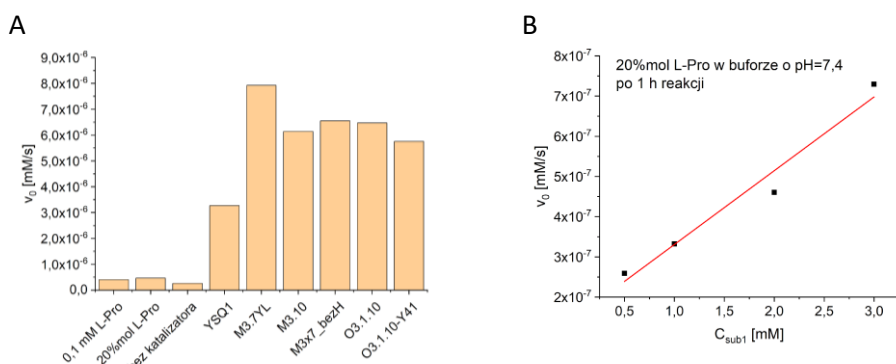
3.4. Porównanie z L-proliną

L-prolina jest znanym katalizatorem krzyżowej reakcji aldolowej, a jej mechanizm działania przypomina aldolazy klasy I.¹⁰¹ Stanowi więc dobry punkt odniesienia do oceny aktywności otrzymanych minibialek katalitycznych; w przeciwieństwie do innych enzymów, cząsteczka ta nie jest ograniczona do wąskiego zakresu substratów.

Rekomendowane warunki reakcji z L-Pro to 20-30% mol katalizatora w mieszaninie 4:1 DMSO z acetonem. Zazwyczaj reakcja ta prowadzona jest przez 1-2 dni.¹⁰² W ramach porównania z minibialkami, zdecydowano się na porównanie aktywności w buforze KPB o pH 7,4, temperaturze pokojowej i po 1 godzinie reakcji. Przetestowano zarówno stężenie L-Pro równe 0,1 mM – takie jak minibialek – jak i 20% mol względem 4-nitrobenzaldehydu.

Stężenie L-Pro odpowiadające 20% mol (0,4 mM) sprawdziło się nieznacznie lepiej niż 0,1 mM. W obydwu przypadkach badane minibialka charakteryzują się od 7- (związek **YSQ1**) do 17-krotnie (związek **M3.7YL**) wyższą wartością v_0 mierzoną dla 2 mM stężenia 4-nitrobenzaldehydu i 2 mM stężenia fenyloacetaldehydu (rysunek 107).

Bazując na otrzymanych wynikach, wywnioskowano, że w wybranych, łagodnych warunkach reakcji – bez grzania i mieszania – zaprojektowane związki stanowią efektywniejsze katalizatory badanej reakcji.



Rysunek 107. (A) Porównanie v_0 [mM·s⁻¹] po 1 godzinie reakcji 2 mM 4-nitrobenzaldehydu z 2 mM fenyloacetaldehydem. Wszystkie pomiary wykonano w KPB 50 mM o pH 7,4. (B) Zależność v_0 od stężenia fenyloacetaldehydu w reakcji katalizowanej przez 20%mol L-Pro.

4. PODSUMOWANIE

W ramach niniejszej pracy zrealizowano przyjęty cel badawczy, polegający na zaprojektowaniu, syntezie oraz charakterystyce pierwszych minibiałek katalizujących reakcję aldolową pomiędzy 4-nitrobenzaldehydem a fenyloacetaldehydem. W literaturze brakuje doniesień o wykorzystaniu białek lub peptydów do katalizy tej reakcji. Jej trudność wynika bezpośrednio z podobieństwa strukturalnego substratów oraz ich skłonności do autokondensacji i utleniania. Większość dotychczasowych prac opisuje reakcje jednosubstratowe, a kondensacje aldolowe ograniczają się do aldehydów reagujących ze znacznym nadmiarem acetonu. Praca ta stanowi więc istotny krok w kierunku projektowania katalizatorów minibiałkowych o wybranej specyficzności substratowej.

W badaniach z powodzeniem wykorzystano trzy zróżnicowane rodzaje rusztowań peptydowych: jedno natywne minibiałko zawierające wnękę oraz dwa zaprojektowane całkowicie *de novo*. Na szczególną uwagę zasługuje fakt, że jedno z nowo opracowanych minibiałek odznacza się niespotykaną dotąd geometrią o topologii HEEEEH. Otrzymano foldamery o wysokiej złożoności strukturalnej, w których budowę włączono cykliczne β -aminokwasy oraz struktury β -kartki. Dotychczas większość znanych peptydów zawierających *trans*-ACPC zostało opracowanych poprzez proste podstawienie α -aminokwasu w minibiałkach takich jak białko PAB, klatka tryptofanowa lub C-końcowa domena wiliny.¹¹¹⁻¹¹³ Ponadto znaczącym i trudnym z perspektywy inżynierii białek osiągnięciem było skuteczne zaprojektowanie struktur łączących stabilizację poprzez rdzeń hydrofobowy z jednoczesną obecnością funkcjonalnej kieszeni wiążącej substrat. Według naszej najlepszej wiedzy do tej pory nie podjęto się projektowania *de novo* minibiałek zawierających wnęki (z wykluczeniem struktur typu *coiled-coil*, w których centrum znajduje się tunel).

Opracowane minibiałka stanowią uniwersalne rusztowania, które mogą znaleźć szerokie zastosowanie. Przeprowadzone badania nie tylko poszerzają wiedzę o projektowaniu struktur *de novo* i relacji pomiędzy strukturą a aktywnością katalityczną, ale stanowią istotny wkład w nurt badawczy na pograniczu enzymologii i organokatalizy, którego potencjał nie został jeszcze w pełni poznany.

5. CZĘŚĆ EKSPERYMENTALNA

5.1. Odczynniki

Wszystkie komercyjnie dostępne rozpuszczalniki i odczynniki użyte w tej pracy zostały zakupione w firmach: Sigma-Aldrich, Merck, Iris Biotech, Trimen oraz Avantor i nie były dodatkowo oczyszczane. Kwas Fmoc-(1S-2S)-*trans*-aminocyklopentanokarboksylowy (*trans*-ACPC) był syntetyzowany przez dr Vitaly'ego Kovalenko, dr Violetę Marković oraz Harry'ego Kent Cumpio lub kupowany w firmie Sigma-Aldrich.

5.2. Komputerowo wspomagane metody projektowania

Struktury PDB oglądano i tworzone grafiki przy pomocy oprogramowania Discovery Studio 2020.

5.2.1. Protokół Blueprint oprogramowania Rosetta

Protokół Blueprint⁷⁹ zastosowano do poprawiania łańcucha głównego minibiałek projektowanych *de novo*. Aplikacja ta wymaga pliku wejściowego zawierającego strukturę początkową oraz nie obsługuje β -aminokwasów, dlatego w projektowanej sekwencji ograniczono się wyłącznie do α -aminokwasów. Wstępny szkielet minibiałka przygotowano w programie Discovery Studio.

Dodatkowo przygotowano plik blueprint określający docelową topologię struktury oraz zestaw harmonicznych ograniczeń odległościowych pomiędzy wybranymi atomami, które muszą być spełnione podczas symulacji. W trakcie obliczeń generowano 10 struktur, z których każda powstawała w wyniku niezależnej trajektorii protokołu (parametr -nstruct 10). Do oceny energii i prowadzenia optymalizacji wykorzystano funkcje oceniające SFXN1 (centroid) **beta_nov15_cst** (full-atom).

Uwzględnienie reszt *trans*-ACPC w projekcie przeprowadzano w kolejnym etapie. Cykliczne β -aminokwasy pozyskiwano ze struktur PDB¹⁰³, a następnie optymalizowano lokalną geometrię w programie Discovery Studio 2020.

Przykładowy plik blueprint (dla minibiałka **O3**):

1 A EB .	4 A E R
2 A EB R	5 A L R
3 A EB R	6 A HA .

7 A HA .	28 A EB .
8 A HA .	29 A EB .
9 A HA .	30 A EB .
10 A HA .	31 A EB R
11 A HA .	32 A LG R
12 A HA R	33 A LG R
13 A H R	34 A EB R
14 A L R	35 A EB R
15 A L R	36 A EB .
16 A HA R	37 A EB .
17 A HA .	38 A EB .
18 A HA .	39 A EB R
19 A HA .	40 A LG R
20 A HA .	41 A LG R
21 A HA .	42 A EB R
22 A HA .	43 A EB .
23 A HA .	44 A EB .
24 A HA R	45 A EB .
25 A LG R	46 A EB .
26 A LB R	47 A EB R
27 A EB R	48 A EB

Plik definiujący odległości między atomami, który wykorzystano w trakcie obliczeń:

```

AtomPair O 31 N 34 HARMONIC 3.0 0.3
AtomPair O 29 N 36 HARMONIC 3.0 0.3
AtomPair O 27 N 38 HARMONIC 3.0 0.3
AtomPair N 23 N 28 HARMONIC 5.8 0.5
AtomPair O 15 N 30 HARMONIC 10.3 0.5
AtomPair O 10 N 18 HARMONIC 4.7 0.5
AtomPair N 12 N 14 HARMONIC 4.5 0.5
AtomPair N 7 O 21 HARMONIC 9.5 0.5
AtomPair N 46 O 35 HARMONIC 3.0 0.3
AtomPair N 39 O 42 HARMONIC 3.0 0.3
AtomPair N 45 O 2 HARMONIC 3.0 0.3
AtomPair N 4 O 45 HARMONIC 3.0 0.3
AtomPair N 2 O 43 HARMONIC 3.0 0.3
AtomPair O 8 N 46 HARMONIC 6.7 0.5

```

5.2.2. Protokół FastDesign oprogramowania Rosetta

Protokół FastDesign¹⁰⁴ wykorzystano do generowania sekwencji minibiałek projektowanych *de novo*. Aplikacja ta umożliwia dobór mutacji w wybranych przez użytkownika pozycjach o wybranej charakterystyce. Metoda Monte Carlo służy stopniowemu dobraniu optymalnej sekwencji, której ocena dokonywana jest na podstawie funkcji oceniającej. Na podstawie analizy szkieletu białkowego wybrano

pożądane typy aminokwasów dla każdej pozycji (wnętrze hydrofobowe – aminokwasy niepolarne i aromatyczne; powierzchnia minibiałka – reszty zasadowe, kwasowe, polarne; helisy – wykluczano reszty Gly, Ser, Cys, Thr, Pro). Reszty wchodzące w skład miejsca aktywnego wprowadzano do struktury wsadowej i uniemożliwiano ich zmianę.

Do obliczeń wykorzystano pakiet Rosetta 3.10, z zastosowaniem funkcji oceniającej **Beta_nov16**¹⁰⁵ i liczby iteracji 5000.

Przykładowy plik resfile (minibiałko **O2**):

USE_INPUT_SC	24 A PIKAA KHREQN
start	25 A ALLAAxc
1 A PIKAA STQNKHRE	26 A PIKAA PG
2 A PIKAA VILFYWMAKH	27 A ALLAAxc
3 A PIKAA STQNKHRE	28 A PIKAA VILFYWMA
4 A PIKAA VILFYWMA	29 A PIKAA STQNKHRE
5 A NATAA	30 A ALLAAxc
6 A PIKAA KHREQN	31 A PIKAA STQNKHRE
7 A NATRO	32 A NATAA
8 A PIKAA AILFYWMKHRQN	33 A NATAA
9 A PIKAA KHREQN	34 A PIKAA STQNKHRE
10 A PIKAA KHREQNLMWYF	35 A PIKAA VILFYWMA
11 A NATRO	36 A PIKAA STQNKHRE
12 A ALLAAxc	37 A PIKAA VILFYWMA
13 A ALLAAxc	38 A PIKAA STQNKHRE
14 A ALLAAxc	39 A NATRO
15 A ALLAAxc	40 A NATAA
16 A ALLAAxc	41 A NATAA
17 A PIKAA AILFYWMKHRQN	42 A PIKAA ILFYWMKHRQNSTV
18 A NATRO	43 A PIKAA STQNKHRE
19 A ALLAAxc	44 A NATAA
20 A PIKAA AILFYWMKHRQNE	45 A PIKAA STQNKHRE
21 A NATRO	46 A PIKAA AILFYWMV
22 A NATRO	47 A PIKAA STQNKHRE
23 A PIKAA AILFYWMKHRQN	48 A PIKAA AILFYWMVK

Opcje (*input flags*):

```
-ex1
-no_optH false
-ex2aro
-use_input_sc
```

```
-no_his_his_pairE  
-nblist_autoupdate true  
-relax:respect_resfile true
```

5.2.3. Wykorzystanie Alphafold w projektowaniu minibiałek

Alphafold wykorzystywany był w celu filtrowania struktur uzyskanych z Rosetta, w szczególności do oceny skłonności do zwijania się β -kartki. Korzystano z serwera *alphafoldserver.com* ze standardowymi ustawieniami.¹⁰⁶ Niedostępne w modelu reszty *trans*-ACPC zastępowano L-Ala lub L-Leu ze względu na częste występowanie w strukturach helikalnych i podobny rozmiar łańcucha bocznego.

5.2.4. Dynamika molekularna

Dynamikę molekularną przeprowadzano w programie AMBER¹⁰⁷, wykorzystując pole siłowe ff15ipq¹⁰⁸. Do solwatacji układu i dodania jonów wykorzystywano aplikację tleap. Zastosowano komórkę symulacyjną (periodic box) o kształcie ściętego oktaedru z odstępem 10 Å. Jony dodano w celu neutralizacji układu.

Symulacje poprzedzano minimalizacją energii obejmującą 1000 cykli algorytmu największego spadku (*steepest descent*) i 1000 kroków metody gradientów sprzężonych (*conjugate gradient*). Promień odcięcia (*cutoff*) ustawiono na 8 Å.

W kolejnym kroku system poddawano ogrzewaniu od 0 K do 300 K z zastosowaniem algorytmu SHAKE w warunkach NVT (stałej objętości). Ustawiono termostat Langevina o współczynniku tarcia 2,0 ps⁻¹. Wybrano krok całkowania (*timestep*) 0,002 ps, a ogrzewanie prowadzono przez 10000 kroków.

Właściwą symulację prowadzono 27 ns w warunkach stałego ciśnienia (NPT), zachowując krok całkowania 0,002 ps. Przyjęto barostat Berendsena i temperaturę 298 K. Zachowano zamrożenie wiązań z H (algorytm SHAKE) i cutoff 8 Å. Trajektorię zapisywano co 2 ps. Do analizy wyników wykorzystano aplikację cpptraj zawartą w pakiecie AmberTools26¹⁰⁹.

5.3. Synteza peptydów

5.3.1. Synteza przy użyciu automatycznego synteзаторa

Peptydy syntetyzowano z wykorzystaniem metody syntezy peptydów na podłożu stałym przy użyciu dwóch typów synteзаторów automatycznych: aparatów wspomaganych mikrofalami (Biotage Initiator⁺ Alastra oraz Liberty Blue CEM) oraz niekomercyjnego aparatu przepływowego.

5.3.1.1. Synteza na aparatach wspomaganych mikrofalami

Do syntezy używano żywicy H-rink amide ChemMatrix o ładowności 0,59 mmol/g w skali 0,06 mmol. Rozpuszczalnikiem stosowanym w syntezie peptydów był DMF, a do sprzęgania wykorzystano odczynniki sprzęgające DIC i OXYMA w stężeniu 0,5 M w DMF w 5-krotnym nadmiarze molowym.

Sprzęganie aminokwasów przeprowadzano dwukrotnie ze względu na długość sekwencji peptydów i związaną z tym agregację łańcucha na żywicy. Pojedyncze sprzęganie Fmoc- α -aminokwasów (stężenie 0,1 M w DMF, 5-krotny nadmiar molowy) trwało 15 minut w 75°C (Biotage Initiator⁺ Alastra) lub 4 minuty w 90°C (Liberty Blue CEM). Reakcje sprzęgania reszty histydyny przeprowadzano w obniżonej temperaturze (50 °C, 10 min). Fmoc- β -aminokwasy (0,1 M, 3-krotny nadmiar molowy) sprzęgano przez 15 min. w 75°C i 30 min. w temperaturze pokojowej.

Do reakcji deprotekcji grupy α -aminowej stosowano 20% roztwór piperydyny w DMF. Po syntezie żywicę przepłukiwano DCM.

5.3.1.2. Synteзатор przepływowy

Do syntezy używano żywicy H-rink amide ChemMatrix o ładowności 0,59 mmol/g w skali 0,035 mmol. Żywicę umieszczano w metalowej kolumnie, przez którą przepływały kolejne odczynniki rozpuszczone w DMF (przepływ 5 ml/min). Wszystkie etapy syntezy przeprowadzano w temperaturze 75°C. Do sprzęgania wykorzystano odczynniki sprzęgające DIC i OXYMA w stężeniu 0,5 M w DMF (6-krotny nadmiar molowy).

Roztwory aminokwasów przygotowywano w stężeniu 0,1 M (6-krotny nadmiar molowy), a wydajność sprzęgania poprawiono poprzez wielokrotne zawracanie mieszaniny sprzęgającej (aminokwas, DIC, OXYMA) na kolumnę przez 450 s (standardowe sprzęganie) lub 900 s (wydłużone sprzęganie). Do reakcji deprotekcji grupy α -aminowej stosowano 20% roztwór piperidyny w DMF. Po syntezie żywicę przepłukiwano DCM. Wszystkie otrzymane peptydy były w formie amidów.

5.3.2. Odcinanie peptydów z żywicy

Po syntezie żywicę z przyłączonym peptydem przenoszono do polipropylenowej strzykawki ze spiekim. W celu odłączenia peptydu od złoża i odblokowania grup bocznych aminokwasów dodawano mieszaninę ściągającej o składzie TFA:TIS:tioanisole:H₂O w proporcjach 85:5:5:5. Żywicę w mieszaninie wytrząsano, a po upływie 5 godzin wytrącano peptyd poprzez dodanie zimnego eteru dietylowego. Osad odwirowywano (10 minut, 6000 rpm) i oczyszczano przy użyciu HPLC.

5.3.3. Oczyszczanie peptydów

Peptydy oczyszczano za pomocą HPLC z wykorzystaniem aparatu UltiMate 3000 LC System (Dionex) na kolumnie preparatywnej C18 (Thermo Scientific, Hypersil Gold 12 μ m, 250 mm $\times$ 20 mm) w układzie rozpuszczalników ACN/H₂O z 0,05% TFA w obu eluentach. Czystość peptydów sprawdzano z wykorzystaniem HPLC analitycznego UFLC Shimadzu na kolumnie C18 (CHROMSHELL® C18-XB HPLC column, 2,6 μ m 150 mm $\times$ 3,0 mm) w tym samym układzie rozpuszczalników.

5.3.4. Identyfikacja produktu

Peptydy identyfikowano za pomocą spektrometrii masowej przy użyciu systemu ATERS LCT Premier XE z detektorem czasu przelotu (TOF) i jonizacją electrospray.

5.4. Dichroizm kołowy

Pomiary CD wykonano na aparacie Jasco J-1500 w kwarcowej kuwecie o długości drogi optycznej 1 mm.

5.4.1. Pomiar widm CD w stałej temperaturze

Widma CD mierzono w stałej temperaturze 25 °C w zakresie długości fal 195-240 nm co 0,2 nm; prędkość skanowania 50 nm/min, akumulując dane z pięciu skanów. Pomiary wykonywano w 50 mM buforze fosforanowym (pH 7,4 – minibiałka bazujące na domenie MvaT i seria O; pH 7 – seria M). Stężenie peptydu wynosiło od 25 do 50 µM. Intensywność CD przeliczano na resztową eliptyczność molową z uwzględnieniem stężenia i liczby reszt aminokwasowych w sekwencji.

5.4.2. Pomiary temperaturowe CD

Pomiary stabilności temperaturowej prowadzono w zakresie temperatur 4-96 °C. W zależności od typu peptydu do pomiaru wybierano inne długości fali. Dla minibiałek nie zawierających reszt *trans*-ACPC wybrano $\lambda = 222$ nm. Dla peptydów projektowanych *de novo* pomiary wykonano przy długościach fali 215 i 208. Próbkę przygotowano analogicznie jak w eksperymencie w stałej temperaturze.

Temperaturę denaturacji wyznaczono z użyciem programu OriginPro 2019, poprzez dopasowanie danych do równania¹¹⁰:

$$y = \frac{1}{1 + e^{\frac{-h \cdot (1 - \frac{x}{T_m})}{x}}} * (b_f - b_u + m_f * x) + b_u,$$

w którym b_f i b_u odnoszą się do eliptyczności w stanie zwiniętym i rozwiniętym, a m_f do nachylenia wykresu dla stanu zwiniętego.

5.5. Pomiary nanoDSF

Pomiary stabilności termicznej z wykorzystaniem techniki nanoDSF prowadzono na aparacie Prometheus™ Panta w zakresie temperatur 20-100°C. Pomiary wykonywano w 50 mM buforze fosforanowym (pH 7,4 – minibiałka z serii O; pH 7 – seria M). Stężenie peptydu wynosiło od 25 do 50 µM. Wartości temperatury rozwijania się

określano na podstawie pierwszej pochodnej krzywej temperaturowej, której wartość odpowiada jej pierwszej pochodnej.

5.6. Pomiary NMR

Pomiary NMR wykonano na spektrometrze NMR Bruker Avance™ 800 MHz na próbkach o stężeniu 2,2-3,6 mg/ml rozpuszczonych w wodzie Milli-Q® z 10% D₂O w temperaturach od 298-311 K. Wyniki były rejestrowane i analizowane przez dr hab. Ewę Rudzińską-Szostak z Katedry Chemii Bioorganicznej, Politechnika Wrocławska.

5.6.1. Tabele

5.6.1.1. Przesunięcia chemiczne – minibiałko O3.1.10-G1.1

Reszta aminokwasowa	proton	Przesunięcie chemiczne [ppm]
R1	HA	3,971
	HB	1,835
	HD	3,115
	HE	7,12
	HG1	1,587
	HG2	1,532
NH2	HN1	7,518
	HN2	7,026
R2	HA	4,282
	HB1	1,709
	HB2	1,677
	HD	3,104
	HE	7,125
	HG1	1,566
	HG2	1,521
Q3	HN	8,746
	HA	4,525
	HB1	1,928
	HB2	1,797
	HG	2,3
Q3	HN	8,578

P4	HN1	6,806
	HN2	7,446
	HA	4,27
	HB1	2,144
	HB2	1,696
	HD1	3,677
Y5	HD2	3,569
	HG	1,882
	HA	4,3
	HB1	2,919
	HB2	2,838
	HD	6,973
X6	HE	6,714
	HN	7,949
	CH21	1,787
	CH22	1,738
	CH23	1,601
	CH24	1,468
E7	CH25	1,416
	HA	2,255
	HB	3,988
	HN	7,766
	HA	3,961
E7	HB1	1,925

	HB2	1,895
	HG	2,275
	HN	8,185
K8	HA	4,03
	HB1	1,647
	HB2	1,618
	HD	1,516
	HE	2,852
	HG1	1,318
	HG2	1,242
	HN	8,101
L9	HA	4,034
	HB	1,423
	HD1	0,696
	HD2	0,6644
	HG	1,374
	HN	7,717
X10	CH21	1,854
	CH22	1,606
	CH23	1,573
	CH24	1,472
	HA	2,476
	HB	4,088
	HN	7,691
K11	HA	4,092
	HB1	1,75
	HB2	1,664
	HD1	1,644
	HD2	1,578
	HE	2,902
	HG1	1,34
	HG2	1,306
	HN	8,007
E12	HA	4,173
	HG1	2,128
	HG2	2,071
	HN	8,078

D13	HA	4,78
	HB1	2,736
	HB2	2,539
	HN	8,185
P14	HA	4,251
	HB1	2,255
	HB2	1,892
	HD1	3,805
	HD2	3,744
	HG	1,953
R15	HA	4,073
	HB	1,781
	HD1	3,139
	HD2	3,098
	HE	7,439
	HG	1,596
	HG1	1,6
	HG2	1,477
K16	HN	8,149
	HA	4,01
	HB	1,618
	HD	1,537
	HE	2,892
	HG1	1,34
	HG2	1,227
	HN	7,642
X17	CH21	1,773
	CH22	1,593
	CH23	1,519
	CH24	1,431
	HA	2,485
	HB	4,043
	HN	7,473
Y18	HA	3,982
	HB	2,917
	HD	6,966
	HE	6,71

	HN	8,031
E19	HA	3,931
	HB1	1,922
	HB2	1,873
	HG1	2,188
	HG2	2,111
	HN	7,958
Y20	HA	4,231
	HB	2,771
	HD	6,744
	HE	6,503
	HN	7,705
X21	CH21	1,679
	CH22	1,601
	CH23	1,467
	CH24	1,416
	CH25	1,328
	HA	2,395
	HB	3,889
	HN	7,827
E22	HA	3,88
	HB	1,782
	HG	2,102
	HN	8,135
H23	HA	4,466
	HB1	3,132
	HB2	2,871
	HD	7,138
	HE	8,486
	HN	8,087
V24	HA	3,96
	HB	1,879
	HG	0,5974
	HN	7,65
G25	HA1	4,011
	HA2	3,893
	HN	8,039

	HA1	3,997
	HA2	3,932
	HN	8,105
E27	HA	4,315
	HB1	1,943
	HB2	1,891
	HG1	2,241
	HG2	2,163
	HN	8,39
Y28	HA	5,217
	HB1	2,872
	HB2	2,788
	HD	6,81
	HE	6,578
	HN	7,801
H29	HA	4,75
	HB1	3,181
	HB2	3,045
	HD	7,134
	HE	8,517
	HN	9,059
L30	HA	4,737
	HB	1,69
	HD	0,8139
	HG	1,474
	HN	8,914
E31	HA	4,833
	HB1	1,932
	HB2	1,746
	HG1	2,225
	HG2	2,16
	HN	8,801
p32	HA	4,676
	HB1	2,206
	HB2	1,855
	HD1	3,739
	HD2	3,424

	HG1	2,072
	HG2	1,936
P33	HA	4,539
	HB1	2,17
	HB2	2,07
	HD1	3,944
	HD2	3,615
	HG1	1,988
	HG2	1,868
T34	HA	4,638
	HB	4,012
	HG	1,03
	HN	7,799
L35	HA	4,759
	HB	1,742
	HD1	0,6831
	HD2	0,6322
	HG	1,311
	HN	8,896
K36	HA	5,272
	HB	1,733
	HD	1,5
	HE1	2,782
	HE2	2,741
	HG1	1,315
	HG2	1,202
	HN	8,723
Y37	HA	5,155
	HB1	2,832
	HB2	2,759
	HD	6,655
	HE	6,362
	HN	8,718
R38	HA	5,035
	HB1	1,74
	HB2	1,658
	HD	3,06

	HE	7,139
	HG1	1,463
	HG2	1,39
	HN	8,441
K39	HA	4,876
	HB	1,942
	HD1	1,742
	HD2	1,674
	HE	2,875
	HG1	1,457
	HG2	1,393
p40	HN	8,459
	HA	4,685
	HB1	2,244
	HB2	1,836
	HD1	3,833
	HD2	3,556
	HG1	2,081
P41	HG2	1,969
	HA	4,403
	HB1	2,011
	HB2	1,885
	HD1	3,769
	HD2	3,588
	HG1	1,737
H42	HG2	1,198
	HA	4,613
	HB1	3,024
	HB2	2,776
	HD	7,081
	HE	8,56
E43	HN	7,654
	HA	4,676
	HB1	1,814
	HB2	1,682
	HG1	2,106
	HG2	2,075

	HN	8,266
Y44	HA	4,546
	HB	2,67
	HD	6,789
	HE	6,596
	HN	8,737
E45	HA	5,216
	HB	1,848
	HG1	2,184
	HG2	2,144
	HN	8,398
L46	HA	4,619
	HB	1,602
	HD	0,7553
	HG	1,518
	HN	9,063

	HA	4,507
K47	HB1	1,764
	HB2	1,676
	HD	1,601
	HE	2,891
	HG1	1,386
	HG2	1,323
	HN	8,547
L48	HA	4,192
	HB	1,513
	HD1	0,6895
	HD2	0,619
	HG1	1,438
	HG2	1,387
	HN	8,391

5.6.1.2. Oddziaływania - minibiałko O3.1.10-G1.1

Typ oddziaływania s oznacza silne oddziaływanie ($< 3 \text{ \AA}$), m – średnie (3-5 $\text{\AA}$), w – słabe ($> 5 \text{ \AA}$).

<i>n, n+1</i>	Typ oddziaływania
R1HA-R2HN	m
R1HB-R2HN	m
R2HN-Q3HN	w
R2HA-Q3HN	s
R2HB1-Q3HN	w
R2HB2-Q3HN	w
R2HG1-Q3HN	w
R2HG2-Q3HN	w
P4HA-Y5HN	s
P4HB2-Y5HN	w
P4HD2-Y5HN	w
Y5HN-X6HN	m
Y5HN-X6CH21	w
Y5HN-X6HN	m
Y5HA-X6HN	s

Y5HB1-X6HN	w
Y5HB2-X6HN	m
Y5HD-X6HN	w
Y5HD-X6HA	w
X6HN-E7HN	m
X6HN-E7HN	w
X6HA-E7HN	s
E7HN-K8HN	m
E7HA-K8HN	s
E7HG-K8HN	w
K8HN-L9HN	m
K8HN-L9HN	s
K8HA-L9HN	s
L9HA-X10HN	s
X10HN-K11HN	w
X10HA-K11HN	s

K11HN-E12HN	m
K11HA-E12HN	s
E12HN-D13HN	m
E12HA-D13HN	s
D13HN-P14HD1	w
D13HN-P14HD2	w
D13HB1-P14HD1	w
D13HB2-P14HD1	w
P14HA-R15HN	w
P14HA-R15HN	m
P14HB2-R15HN	m
P14HG-R15HN	m
P14HD1-R15HN	m
P14HD2-R15HN	w
R15HN-K16HN	s
R15HA-K16HN	m
K16HN-X17HN	s
K16HN-X17HN	s
K16HA-X17HN	m
X17HN-Y18HN	m
X17HN-Y18HN	w
X17HA-Y18HD	w
X17HA-Y18HN	s
X17CH23-Y18HN	m
Y18HN-E19HN	m
Y18HA-E19HN	m
Y18HB-E19HN	s
Y18HD-E19HN	m
Y18HD-E19HA	w
Y18HD-E19HG1	w
Y18HD-E19HG2	w
Y18HE-E19HG2	w
E19HN-Y20HN	s
E19HN-Y20HN	s
E19HA-Y20HN	m
Y20HN-X21HN	s
Y20HN-X21HN	s

Y20HA-X21HN	m
Y20HB-X21HB	w
Y20HB-X21HN	m
Y20HD-X21HN	m
X21HN-E22HN	m
X21HN-E22HN	w
X21HA-E22HN	s
X21CH21-E22HN	m
E22HA-H23HN	s
E22HG-H23HD	w
E22HG-H23HN	w
H23HN-V24HG	w
H23HN-V24HN	s
H23HA-V24HN	m
H23HB1-V24HN	w
H23HB2-V24HN	w
H23HB2-V24HG	m
H23HD-V24HN	w
H23HD-V24HG	m
V24HN-G25HN	s
V24HN-G25HA2	m
V24HN-G25HN	s
V24HA-G25HN	s
V24HG-G25HA2	s
V24HG-G25HN	m
G25HN-G26HN	m
G25HA1-G26HN	s
G25HA2-G26HN	s
G26HN-E27HN	m
G26HA1-E27HN	s
G26HA2-E27HN	s
E27HN-Y28HN	m
E27HA-Y28HD	w
E27HA-Y28HN	s
E27HG1-Y28HN	w
E27HG2-Y28HN	w
Y28HN-H29HN	w

Y28HA-H29HN	s
Y28HB1-H29HN	m
Y28HB2-H29HN	m
Y28HD-H29HN	m
Y28HD-H29HA	m
Y28HD-H29HB2	w
H29HA-L30HN	s
H29HB1-L30HN	w
H29HB2-L30HN	m
H29HD-L30HN	w
L30HN-E31HN	m
L30HA-E31HN	s
L30HB-E31HN	m
L30HG-E31HN	w
L30HD-E31HN	m
E31HN-P32HD1	w
E31HN-P32HD2	w
P32HA-P33HD1	s
P32HA-P33HD2	s
P32HG1-P33HA	s
P33HA-T34HN	m
P33HD1-T34HN	m
P33HD2-T34HN	w
T34HN-L35HN	w
T34HN-L35HD1	w
T34HA-L35HN	s
T34HB-L35HN	m
T34HG-L35HN	m
L35HN-K36HN	w
L35HN-K36HN	w
L35HA-K36HN	s
L35HD1-K36HE1	m
L35HD1-K36HN	m
L35HD2-K36HE1	m
L35HD2-K36HN	w
K36HN-Y37HE	w
K36HA-Y37HD	w

K36HA-Y37HN	s
Y37HN-R38HN	w
Y37HA-R38HN	s
Y37HB1-R38HN	m
Y37HB2-R38HN	m
Y37HD-R38HN	m
R38HA-K39HN	s
K39HN-P40HD1	w
K39HN-P40HD2	w
K39HG1-P40HD1	w
K39HG1-P40HD2	w
K39HG2-P40HD1	w
K39HG2-P40HD2	w
P40HA-P41HD1	s
P40HA-P41HD2	m
P41HA-H42HN	m
P41HG2-H42HD	w
P41HG2-H42HE	w
P41HG2-H42HN	w
P41HD1-H42HD	m
P41HD1-H42HN	m
P41HD2-H42HD	w
P41HD2-H42HN	w
H42HN-E43HN	w
H42HA-E43HN	s
H42HB1-E43HN	w
H42HB2-E43HN	m
E43HN-Y44HN	w
E43HA-Y44HN	s
E43HB1-Y44HN	m
E43HG1-Y44HN	w
E43HG2-Y44HN	w
Y44HN-E45HN	w
Y44HA-E45HN	s
Y44HB-E45HN	m
Y44HD-E45HN	w
E45HN-L46HN	w

E45HA-L46HN	s
E45HB-L46HN	m
E45HG1-L46HN	w
E45HG2-L46HN	w
L46HN-K47HN	w
L46HA-K47HN	s
L46HD-K47HN	m
K47HN-L48HB	m
K47HN-L48HN	m
K47HA-L48HN	s
K47HB1-L48HN	m
K47HB2-L48HN	m
K47HG2-L48HN	w

<i>n, n+2</i>	
Y5HD-E7HN	w
P14HA-K16HN	w
R15HN-X17HN	w
R15HN-X17HN	w
X17HB-E19HN	w
X21HA-H23HN	w
G26HA1-Y28HD	w
Y28HD-L30HN	w
Y28HD-L30HD	w
Y28HE-L30HD	m
H29HD-E31HG1	m
H29HD-E31HG2	m
L30HB-P32HD2	w
L30HG-P32HD2	w
L30HD-P32HD2	w
L35HD1-Y37HD	w
L35HD1-Y37HE	w
L35HD2-Y37HD	m
L35HD2-Y37HE	m
H42HN-Y44HE	w
H42HB1-Y44HD	w
H42HB1-Y44HE	m

H42HB2-Y44HE	m
Y44HD-L46HD	w
Y44HE-L46HD	w

<i>n, n+3</i>	
X6HB-L9HN	m
R15HA-Y18HD	w
K16HA-E19HN	m
X17HN-Y20HN	w
X17HA-Y20HA	w
X17HB-Y20HD	m
X17HB-Y20HB	m
Y18HA-X21HA	m
Y20HA-H23HD	m
Y20HA-H23HB1	w
Y20HA-H23HB2	w
Y20HD-H23HB1	w
Y20HD-H23HB2	w
Y20HE-H23HB1	w
Y20HE-H23HB2	w
G25HA2-Y28HD	w
G25HA2-Y28HE	w
E31HN-T34HB	w
E31HN-T34HG	w
E31HN-T34HN	w
K39HN-H42HB1	w
K39HN-H42HN	m

<i>n, n+4</i>	
Q3HG-E7HN	m
Y5HD-L9HD2	w
Y5HE-L9HD2	w
Y20HD-V24HG	m
Y20HE-V24HG	m
V24HG-Y28HD	m
V24HG-Y28HE	w
L30HD-T34HN	w

E31HN-L35HD1	w
--------------	---

<i>long range (n, n≥5)</i>	
L9HD2-Y20HD	w
L9HD2-Y20HE	w
X17HN-L48HD1	w
Y18HA-L30HD	w
Y18HD-L30HD	w
Y18HD-L48HD1	m
Y18HD-L48HD2	w
Y18HE-L30HD	w
Y18HE-L48HD1	m
Y18HE-L48HD2	w
Y20HD-L35HD2	w
Y20HD-L46HD	w
Y20HD-L48HD1	w
Y20HE-L35HD2	w
Y20HE-L46HD	w
Y20HE-L48HD1	w
V24HG-Y37HD	m
V24HG-Y37HE	m
Y28HA-Y37HD	m
Y28HA-Y37HN	m
Y28HA-R38HN	w
Y28HB1-L35HD1	m
Y28HB1-L35HD2	m
Y28HB1-Y37HD	m
Y28HB1-Y37HE	m
Y28HD-L35HD1	m
Y28HD-L35HD2	m
Y28HD-Y37HA	w
Y28HD-L46HD	w

Y28HE-L35HD1	m
Y28HE-L35HD2	w
Y28HE-L46HD	w
H29HN-K36HN	m
T34HA-L48HN	m
T34HG-L46HN	m
T34HG-L48HN	w
L35HN-L46HN	m
L35HN-L48HN	w
L35HD1-L46HN	m
L35HD2-L46HN	w
K36HA-L46HN	m
Y37HD-Y44HB	w
Y37HD-L46HN	w
Y37HD-L46HD	m
Y37HE-Y44HB	m
Y37HE-L46HN	w
Y37HE-L46HD	m
R38HA-Y44HD	m
R38HA-Y44HN	m
K39HN-Y44HN	w
K39HN-Y44HD	m
K39HN-Y44HE	m
L48HN-NH2HN1	m
L48HN-NH2HN2	w
L48HA-NH2HN1	m
L48HA-NH2HN2	m
L48HG2-NH2HN1	w
L48HD1-NH2HN1	w
L48HD1-NH2HN2	w
L48HD2-NH2HN1	w
L48HD2-NH2HN2	w

5.6.1.3. Przesunięcia chemiczne – minibialko O3.1.10A

Reszta	Proton	Przesunięcie chemiczne [ppm]
HA1	HN	8,155
K1	HA	3,934

	HN	8,063
R2	HA	4,293
	HN	8,653

Q3	HA	4,519
	HN	8,55
P4	HA	4,263
	HD1	3,673
	HD2	3,538
Y5	HA	4,436
	HB	2,875
	HN	8,02
X6	HA	2,094
	HB	3,882
	HN	8,004
E7	HA	3,777
	HN	8,108
E8	HA	4,047
	HN	7,86
L9	HA	3,914
	HN	7,592
X10	HA	2,407
	HB	3,993
	HN	7,588
K11	HA	4,022
	HN	7,817
E12	HA	4,143
	HN	7,859
D13	HA	4,797
	HN	8,181
P14	HA	4,21
	HD1	3,787
	HD2	3,633
R15	HA	4,065
	HN	8,066
K16	HA	3,989
	HN	7,563
X17	HA	2,474
	HB	4,008
	HN	7,352
Y18	HA	3,994

	HB	2,924
	HN	8,062
E19	HA	3,919
	HN	7,907
Y20	HA	4,229
	HN	7,649
X21	HA	2,354
	HB	3,827
	HN	7,809
Q22	HA	3,923
	HN	8,023
H23	HA	4,536
	HB1	3,148
	HB2	2,868
	HN	8,149
V24	HA	4,014
	HG	0,586
	HN	7,664
G25	HA1	3,818
	HA2	4,047
	HN	8,155
Q26	HA	4,287
	HN	8,183
Y27	HA	5,214
	HB1	2,917
	HN	7,865
E28	HA	4,549
	HN	9,132
L29	HA	4,934
	HD	4,778
	HN	8,725
H30	HA	5,109
	HB1	3,146
	HB2	2,968
	HN	8,854
p31	HA	4,689
	HD1	3,69

	HD2	3,445
P32	HA	4,562
	HD1	3,966
	HD2	3,62
T33	HA	4,738
	HB	4,071
	HG	1,076
	HN	7,84
L34	HA	5,048
	HD1	0,685
	HD2	0,548
	HN	8,931
K35	HA	5,53
	HN	9,017
W36	HA	5,127
	HB1	3,298
	HB2	3,157
	HN	8,724
R37	HA	5,089
	HN	8,521
K38	HA	4,887
	HN	8,479
p39	HA	4,552
	HD1	3,849

	HD2	3,57
P40	HA	4,379
	HD1	3,769
	HD2	3,584
H41	HA	4,503
	HB1	3,024
	HB2	2,725
	HN	7,709
E42	HA	4,553
	HN	8,198
Y43	HA	4,322
	HN	8,584
E44	HA	5,309
	HN	8,012
L45	HA	4,636
	HD1	0,878
	HD2	0,84
	HN	9,161
K46	HA	4,658
	HN	8,519
L47	HA	4,425
	HD1	4,692
	HD2	0,66
	HN	8,833

5.6.1.4. Przesunięcia chemiczne – minibialko O3.1.10.Y

Reszta aminokwasowa	Proton	Przesunięcie chemiczne [ppm]
K1	HA	3,938
E2	HA	4,316
	HN	8,73
NH2	HN1	7,03
	HN2	7,522
Q3	HA	4,515
	HN	8,567
P4	HA	4,268
	HD1	3,67

	HD2	3,523
Y5	HA	4,364
	HB1	2,913
	HB2	2,831
	HN	7,796
X6	HA	2,208
	HB	3,906
	HN	7,817
Q7	HA	3,825
	HN	8,157
E8	HA	4,065

	HN	7,944
L9	HA	3,928
	HN	7,582
X10	HA	2,442
	HB	4,049
	HN	7,57
K11	HA	4,029
	HN	7,853
E12	HA	4,155
	HN	7,944
D13	HA	4,763
	HN	8,108
P14	HA	4,194
	HD1	3,797
	HD2	3,718
R15	HA	4,043
	HN	8,144
K16	HA	3,986
	HN	7,595
X17	HA	2,487
	HB	4,012
	HN	7,404
Y18	HA	4,003
	HN	8,104
R19	HA	3,893
	HN	7,803
Y20	HA	4,289
	HB1	2,777
	HB2	2,64
	HN	7,613
X21	HA	2,367
	HB	3,913
	HN	7,754
R22	HA	4,013
	HN	8,082
H23	HA	4,552
	HB1	3,126

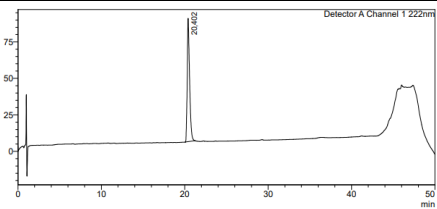
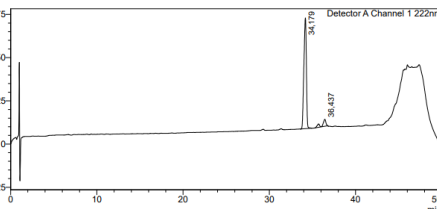
	HB2	2,845
	HN	8,307
V24	HA	4,035
	HN	7,768
G25	HA1	4,037
	HA2	3,826
	HN	8,242
E26	HA	4,306
	HN	8,186
Y27	HA	5,16
	HB1	2,864
	HB2	2,786
	HN	7,869
E28	HA	4,513
	HN	9,012
L29	HA	4,841
	HN	8,66
H30	HA	5,082
	HB1	3,14
	HB2	2,955
	HN	8,818
p31	HA	4,677
	HD1	3,677
	HD2	3,433
P32	HA	4,536
	HD1	3,954
	HD2	3,616
	HN	4,538
T33	HA	4,678
	HB	4,074
	HG	1,071
	HN	7,833
L34	HA	4,958
	HB	1,755
	HD1	0,685
	HD2	0,559
	HG	1,366

	HN	8,855
K35	HA	5,404
	HN	8,902
W36	HA	5,118
	HB1	3,235
	HB2	3,101
	HN	8,727
R37	HA	5,018
	HN	8,377
K38	HA	4,807
	HN	8,512
p39	HA	4,642
	HD1	3,794
	HD2	3,541
P40	HA	4,285
	HD1	3,675
	HD2	3,546
Y41	HA	4,444

	HB1	2,77
	HB2	2,64
	HN	7,579
E42	HA	4,61
	HN	8,034
Y43	HA	4,403
	HB1	2,951
	HB2	2,881
	HN	7,75
E44	HA	5,216
	HN	8,047
L45	HA	4,593
	HN	9,045
K46	HA	4,606
	HN	8,509
L47	HA	4,214
	HN	8,588

5.7. Pomiary aktywności katalitycznej

Pomiary aktywności katalitycznej mierzono korzystając z HPLC analitycznego UFLC Shimadzu na kolumnie C18 (CHROMSHELL® C18-XB HPLC column, 2,6 µm 150 mm × 3,0 mm) w układzie rozpuszczalników H₂O/ACN z 0,05% TFA. W pierwszej kolejności przygotowano próbkę referencyjną produktu, wobec której porównywano kolejne chromatogramy. Związek otrzymano poprzez reakcję 4-nitrobenzaldehydu z fenyloacetaldehydem w warunkach zasadowych (1:1 4-nitrobenzaldehyd: fenyloacetaldehyd, 0,1 M NaOH w wodzie z acetonitrylem (4:1), reakcja w temp. pokojowej 24 h, oczyszczanie przy użyciu HPLC w tym samym układzie). Związek zidentyfikowano na podstawie LC-MS.

produkt	chromatogram	MS obliczone	MS doświadczalne
Produkt aldolowy		272,0923	272,1440
Produkt nienasycony		254,0817	254,0786

Ilość otrzymanego produktu obliczano na podstawie krzywej standardowej. Wszystkie parametry kinetyczne reakcji obliczono względem produktu nienasyconego, ze względu na całkowitą dehydratację produktu. Nachylenie krzywej standardowej wynosiło $4,93 \cdot 10^{-8}$.

Reakcje z peptydem prowadzono w 50 mM buforze fosforanowym o pH = 7,4, przy stałym stężeniu 4-nitrobenzaldehydu (2 mM) i stężeniem fenylacetaldehydu od 0,5-5 mM w temperaturze pokojowej, bez mieszania. Stężenie minibiałka wynosiło 0,1 mM. Po godzinie od rozpoczęcia reakcji mieszaninę rozcieńczano dwukrotnie acetonitrylem.

Do pomiarów wybrano gradient o przepływie 0,9 mL/min:

0 min – 10%B; 2 min – 10%B; 41 min – 50%B; 43 min – 90%B; 45 min – 90%B; 48 min – 10%B; 50 min – 10%B.

Próby kontrolne mierzono analogicznie, bez dodatku peptydu. Parametr k_{uncat} wyznaczono poprzez dopasowanie liniowej linii trendu do otrzymanych danych i wynosi $7,63 \cdot 10^{-8} \pm 1,26 \cdot 10^{-8}$ 1/s.

5.8. Charakterystyka związków

W otrzymanych widmach masowych minibiałek obserwowano liczne sygnały pochodzące od jonów o różnym stanie naładowania. Do identyfikacji produktów syntezy wybrano jon $[M+6H]^{6+}$. Czystość związków oceniano metodą analitycznego HPLC, przyjmując czystość > 95% za odpowiednią do dalszych eksperymentów.

Nazwa	MS obliczone [M+6H] ⁶⁺	MS doświadczalne [M+6H] ⁶⁺	HPLC analityczne czas retencji [min]	gradient
Mvat48	863,1214	863,2894	6,697	A
Mvat48_1R	867,7891	867,7555	6,718	A
Mvat48_6R	867,7891	867,7555	6,704	A
Mvat48_17R	867,7891	867,7555	6,726	A
Mvat48_28R	867,7891	867,7555	9,933	E
Mvat48_3R	867,7891	867,7555	10,282	D
MvaT48-3K28K	877,1245	877,1259	6,742	A
MvaT48-3K	862,9631	862,9205	6,799	A
MvaT48-0K	886,4598	886,4586	6,813	A
allR	857,7886	857,7546	11,877	B
allR1	861,7672	861,5729	5,119	C
allR2	857,4550	857,4541	12,054	B
allR3	880,1372	880,2939	11,951	B
allR4	868,4586	868,4548	11,973	B
allR5	854,2813	854,4426	12,178	B
allR6	861,4507	861,2769	11,777	B
allR7	858,9581	859,1561	6,490	A
allR8	858,791	858,7854	12,293	B
allR9	876,9556	876,7849	11,885	B
allR10	870,9616	870,7934	11,775	B
allR11	858,791	858,7854	12,243	B
allR12	854,1172	854,1105	12,276	B
allR13	858,791	858,7921	6,536	A
allR14	860,1191	860,1244	8,233	D
allR15	854,1172	856,2834	6,571	A
allR11Y	869,2941	869,2863	6,469	A
allR11F	866,6282	866,6276	6,545	A
allR11YS	878,9579	878,7911	9,876	D
allR11YSR	888,4731	888,2729	6,351	A
allR11YS-Y24	882,6257	882,5927	6,456	A
allR11YS-Y25	875,4562	875,4575	6,226	A
allR11YS-Y29	889,6335	889,6144	6,574	A

allR11YSQ	872.7958	872,6290	6,543	A
YSQ1	872,2921	872,2849	6,822	A
YSQ2	873,2878	873,1192	6,812	A
YSQ3	877,4579	877,4557	11,212	E
YSQ4	872,9598	872,9580	9,935	E
O1	943.0691	943.0076	4,955	F
O2	941,6612	941,6644	5,608	A
O3	955.0801	955.0083	5,644	A
O3.1	979.1100	979.0238	4,622	C
O3.2	958.0901	958.0097	4,629	C
O3.3	967.5988	967.5160	4,497	C
O3.4	965.9192	965.8483	4,224	C
O3.5	948.5674	948.5014	4,037	C
O3.6	943.7272	943.6569	4,285	C
O3.1.1	951.0049	950.9999	10,104	B
O3.1.2	990,8466	990,8482	6,225	A
O3.1.3	972,8550	972,8389	5,920	A
O3.1.4	971,8472	971,8318	6,201	A
O3.1.5	961,5112	961,5049	6,006	A
O3.1.6	977,5090	977,5105	5,807	A
O3.1.7	976,3489	976,3442	5,784	A
O3.1.8	957,1739	957,1765	5,045	C
O3.1.9	971,5336	971,5292	6,320	A
O3.1.10	988,0305	988,0329	6,390	A
O3.1.11	911,8697	991,8689	6,400	A
O3.1.10Y	984,1969	984,1922	6,242	A
O3.1.10YW	996,3627	996,3560	6,255	A
O3.1.10YW2	996,3627	996,3560	6,303	A
O3.1.10Y41	992,3669	992,3644	6,303	A
O3.1.10D41	984,3609	984,3627	6,321	A
O3.1.10.Q	986,3688	986,3606	8,352	E
O3.1.10.KE	986,5328	986,5248	12,548	B
O3.1.10.QE	986,3686	986,3178	6,394	A
O3.1.10.Y	996,8706	996,8151	6,207	A
O3.1.10A	987,8628	987,8526	6,323	A
O3.1.10B	996,3730	996,3702	6,407	A
O3.1.10C	988,3669	988,3599	6,327	A
O3.1.10_G1	998,3682	998,3367	12,194	B
O3.1.10_G2	1002,2042	1002,1530	12,369	B
O3.1.10_G1.1	998,3682	998,3583	7,913	D
M1	984,5387	984,5337	11,056	B

M2	982,2028	982,1965	11,004	B
M3	982,8746	982,8731	7,611	D
M4	986,8704	986,8665	10,612	B
M5	978,5405	978,5323	10,914	B
M6	982,6968	982,6950	6,010	A
M7	998,1985	998,1644	6,424	D
M3x7	994,3625	994,1910	5,967	A
M3x7_tylkoH	978,5405	978,5043	7,079	D
M3x7_bezH	982,8746	982,8239	8,149	D
M3.1	978,5308	978,5263	7,578	D
M3.2	982,5466	982,4962	8,026	D
M3.3	978,0308	978,0211	8,260	D
M3.4	982,8625	982,8524	5,960	A
M3.5	982,8625	982,8595	8,195	D
M3.6	987,3643	987,3743	5,820	A
M3.7	997,8839	997,8844	5,942	A
M3.8	982,8625	982,8595	5,990	A
M3.9	999,3961	999,3422	6,142	D
M3.10	987,0503	987,0458	5,978	A
M3.7-YL	997,8839	997,8773	8,050	D
M3.7-H	999,3778	999,3709	6,140	D
M3.7-YH2	1001,8796	1001,8508	6,841	D
M3.7-YW	1015,8778	1015,8749	8,197	D

Gradienty:

A	przepływ: 0,9 mL/min; t=0 min – 10%B; t=12,50 min – 90%B; t=15 min – 90%B; t=17 min – 10%B
B	przepływ: 0,9 mL/min; t=0 min – 10%B; t=32 min – 90%B; t=37 min – 90%B; t=45 min – 10%B
C	przepływ: 0,9 mL/min; t=0 min – 10%B; t=9,50 min – 90%B; t=10,50 min – 90%B; t=11 min – 10%B
D	przepływ: 0,9 mL/min; t=0 min – 20%B; t=18 min – 50%B; t=20 min – 10%B
E	przepływ: 0,9 mL/min; t=0 min – 10%B; t=20 min – 90%B; t=23 min – 90%B; t=30 min – 10%B

6. BIBLIOGRAFIA

1. Li WL, Head-Gordon T. Catalytic Principles from Natural Enzymes and Translational Design Strategies for Synthetic Catalysts. *ACS Cent Sci.* 2021;7(1):72-80. doi:10.1021/acscentsci.0c01556
2. Giraldo J, Roche D, Rovira X, Serra J. The catalytic power of enzymes: Conformational selection or transition state stabilization? *FEBS Lett.* 2006;580(9):2170-2177. doi:10.1016/j.febslet.2006.03.060
3. Schramm VL. Introduction: Principles of enzymatic catalysis. *Chem Rev.* 2006;106(8):3029-3030. doi:10.1021/cr050246s
4. Kraut J. How Do Enzymes Work? *Science.* 1988;242(4878):533-540.
5. Hammes-Schiffer S. Catalytic efficiency of enzymes: a theoretical analysis. *Biochemistry.* 2013;52(12):2012-2020. doi:10.1021/bi301515j
6. Ferreira P, Fernandes PA, Ramos MJ. Modern computational methods for rational enzyme engineering. *Chem Catal.* 2022;2(10):2481-2498. doi:10.1016/j.checat.2022.09.036
7. Świderek K, Tuñón I, Moliner V, Bertran J. Computational strategies for the design of new enzymatic functions. *Arch Biochem Biophys.* 2015;582:68-79. doi:10.1016/j.abb.2015.03.013
8. McGeagh JD, Ranaghan KE, Mulholland AJ. Protein dynamics and enzyme catalysis: Insights from simulations. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1814(8):1077-1092. doi:10.1016/j.bbapap.2010.12.002
9. Linder M. Computational enzyme design: Advances, hurdles and possible ways forward. *Comput Struct Biotechnol J.* 2012;2(3):e201209009. doi:10.5936/csbj.201209009
10. Diaz DJ, Kulikova AV, Ellington AD, Wilke CO. Using machine learning to predict the effects and consequences of mutations in proteins. *Curr Opin Struct Biol.* 2023;78:102518. doi:10.1016/j.sbi.2022.102518
11. Kellogg EH, Leaver-Fay A, Baker D. Role of conformational sampling in computing mutation-induced changes in protein structure and stability. *Proteins.* 2011;79(3):830-838. doi:10.1002/prot.22921
12. Porter JL, Rusli RA, Ollis DL. Directed Evolution of Enzymes for Industrial Biocatalysis. *ChemBioChem.* 2016;17(3):197-203. doi:10.1002/cbic.201500280
13. Padiolleau-Lefèvre S, Naya R Ben, Shahsavarian MA, Friboulet A, Avelle B. Catalytic antibodies and their applications in biotechnology: State of the art. *Biotechnol Lett.* 2014;36(7):1369-1379. doi:10.1007/s10529-014-1503-8
14. Vaissier Welborn V, Head-Gordon T. Computational Design of Synthetic Enzymes. *Chem Rev.* 2019;119(11):6613-6630. doi:10.1021/acs.chemrev.8b00399
15. Frushicheva MP, Cao J, Chu ZT, Warshel A. Exploring challenges in rational enzyme design by simulating the catalysis in artificial kemp eliminase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(39):16869-16874. doi:10.1073/pnas.1010381107

16. Raj KS, Srivastava S, Durani S. Design of a zinc-finger hydrolase with a synthetic $\alpha\beta\beta$ protein. *PLoS One*. 2014;9(5):5-12. doi:10.1371/journal.pone.0096234
17. Ahern W, Yim J, Tischler D, et al. Atom level enzyme active site scaffolding using RFDiffusion2. *bioRxiv*. Preprint published online April 9, 2025. doi:10.1101/2025.04.09.648075
18. Röthlisberger D, Khersonsky O, Wollacott AM, et al. Kemp elimination catalysts by computational enzyme design. *Nature*. 2008;453(7192):190-195. doi:10.1038/nature06879
19. Nosrati GR, Houk KN. SABER: A computational method for identifying active sites for new reactions. *Protein Sci*. 2012;21(5):697-706. doi:10.1002/pro.2055
20. Weitzner BD, Kipnis Y, Daniel AG, Hilvert D, Baker D. A computational method for design of connected catalytic networks in proteins. *Protein Sci*. 2019;28(12):2036-2041. doi:10.1002/pro.3757
21. Siegel JB, Zanghellini A, Lovick HM, et al. Computational design of an enzyme catalyst for a stereoselective bimolecular diels-alder reaction. *Science*. 2010;329(5989):309-313. doi:10.1126/science.1190239
22. Cooper S, Khatib F, Treuille A, et al. Predicting protein structures with a multiplayer online game. *Nature*. 2010;466(7307):756-760. doi:10.1038/nature09304
23. Eiben CB, Siegel JB, Bale JB, et al. Increased Diels-Alderase activity through backbone remodeling guided by Foldit players. *Nat Biotechnol*. 2012;30(2):190-192. doi:10.1038/nbt.2109
24. Preiswerk N, Beck T, Schulz JD, et al. Impact of scaffold rigidity on the design and evolution of an artificial Diels-Alderase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(22):8013-8018. doi:10.1073/pnas.1401073111
25. Fuxreiter M, Mones L. The role of reorganization energy in rational enzyme design. *Curr Opin Chem Biol*. 2014;21:34-41. doi:10.1016/j.cbpa.2014.03.011
26. Bhowmick A, Sharma SC, Honma H, Head-Gordon T. The role of side chain entropy and mutual information for improving the de novo design of Kemp eliminases KE07 and KE70. *Phys Chem Chem Phys*. 2016;18(28):19386-19396. doi:10.1039/c6cp03622h
27. The Influence of Protein Dynamics on the Success of Computational Enzyme Design. *J Am Chem Soc*. 2009;131(39):14111-14115. doi:10.1021/ja905396s
28. Privett HK, Kiss G, Lee TM, et al. Iterative approach to computational enzyme design. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(10):3790-3795. doi:10.1073/pnas.1118082108
29. Kędzierski P, Moskal M, Sokalski WA. Catalytic Fields as a Tool to Analyze Enzyme Reaction Mechanism Variants and Reaction Steps. *J Phys Chem B*. 2021;125(42). doi:10.1021/acs.jpcc.1c05256
30. Fried SD, Boxer SG. Electric fields and enzyme catalysis. *Annu Rev Biochem*. 2017;86:387-415. doi:10.1146/annurev-biochem-061516-044432
31. Jha SK, Ji M, Gaffney KJ, Boxer SG. Direct measurement of the protein response to an electrostatic perturbation that mimics the catalytic cycle in ketosteroid isomerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(40):16612-16617. doi:10.1073/pnas.1113874108

32. Vaissier V, Sharma SC, Schaettle K, Zhang T, Head-Gordon T. Computational Optimization of Electric Fields for Improving Catalysis of a Designed Kemp Eliminate. *ACS Catal.* 2018;8(1):219-227. doi:10.1021/acscatal.7b03151
33. Beker W, Sokalski WA. Bottom-Up Nonempirical Approach to Reducing Search Space in Enzyme Design Guided by Catalytic Fields. *J Chem Theory Comput.* 2020;16(5). doi:10.1021/acs.jctc.0c00139
34. Wang X, Zhang X, Peng C, et al. D3DistalMutation: A Database to Explore the Effect of Distal Mutations on Enzyme Activity. *J Chem Inf Model.* 2021;61(5):2499-2508. doi:10.1021/acs.jcim.1c00318
35. McMurrough TA, Dickson RJ, Thibert SMF, Gloor GB, Edgell DR. Control of catalytic efficiency by a coevolving network of catalytic and noncatalytic residues. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(23). doi:10.1073/pnas.1322352111
36. Listov D, Vos E, Hoffka G, et al. Complete computational design of high-efficiency Kemp elimination enzymes. *Nature.* 2025;643(8074):1421-1427. doi:10.1038/s41586-025-09136-2
37. Jiang L, Althoff EA, Clemente FR, et al. De novo computational design of retro-aldol enzymes. *Science.* 2008;319(5868):1387-1391. doi:10.1126/science.1152692
38. Hou Q, Rooman M, Pucci F. Enzyme Stability-Activity Trade-Off: New Insights from Protein Stability Weaknesses and Evolutionary Conservation. *J Chem Theory Comput.* 2023;19(12):3664-3671. doi:10.1021/acs.jctc.3c00036
39. Braun M, Tripp A, Chakatok M, et al. Computational enzyme design by catalytic motif scaffolding. *bioRxiv.* Preprint published online August 2, 2024. doi:10.1101/2024.08.02.606416
40. Lauko A, Pellock SJ, Sumida KH, et al. Computational design of serine hydrolases. *Science.* 2025;388(6744). doi:10.1126/science.adu2454
41. De Raffele D, Martí S, Moliner V. Understanding the Directed Evolution of de Novo Retro-Aldolases from QM/MM Studies. *ACS Catal.* 2020;10(14):7871-7883. doi:10.1021/acscatal.0c01165
42. Althoff EA, Wang L, Jiang L, et al. Robust design and optimization of retroaldol enzymes. *Protein Sci.* 2012;21(5):717-726. doi:10.1002/pro.2059
43. Müller MM, Windsor MA, Pomerantz WC, Gellman SH, Hilvert D. A rationally designed aldolase foldamer. *Angew Chem Int Ed.* 2009;48(5):922-925. doi:10.1002/anie.200804996
44. Giger L, Caner S, Obexer R, et al. Evolution of a designed retro-aldolase leads to complete active site remodeling. *Nat Chem Biol.* 2013;9(8):494-498. doi:10.1038/nchembio.1276
45. Obexer R, Godina A, Garrabou X, et al. Emergence of a catalytic tetrad during evolution of a highly active artificial aldolase. *Nat Chem.* 2017;9(1):50-56. doi:10.1038/nchem.2596
46. Kipnis Y, Chaib AO, Vorobieva AA, et al. Design and optimization of enzymatic activity in a de novo β -barrel scaffold. *Protein Sci.* 2022;31(11):e4405. doi:10.1002/pro.4405
47. Porter Goff KL, Nicol D, Williams C, et al. Stabilizing and Understanding a Miniprotein by Rational Redesign. *Biochemistry.* 2019;58(28):3060-3064. doi:10.1021/acs.biochem.9b00067

48. Crook ZR, Nairn NW, Olson JM. Miniproteins as a Powerful Modality in Drug Development. *Trends Biochem Sci.* 2020;45(4):332-346. doi:10.1016/j.tibs.2019.12.008
49. Anfinsen CB. Principles that govern protein folding. *Science.* 1973;181(4096):223-230.
50. Pace CN, Scholtz JM, Grimsley GR. Forces stabilizing proteins. *FEBS Lett.* 2014;588(14):2177-2184. doi:10.1016/j.febslet.2014.05.006
51. Klug A. The discovery of zinc fingers and their development for practical applications in gene regulation and genome manipulation. *Q Rev Biophys.* 2010;43(1):1-21. doi:10.1017/S0033583510000089
52. Li C, Wally H, Miller SJ, Lu CD. The multifaceted proteins MvaT and MvaU, members of the H-NS family, control arginine metabolism, pyocyanin synthesis, and prophage activation in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J Bacteriol.* 2009;191(20):6211-6218. doi:10.1128/JB.00888-09
53. Chen Q, Xiao Y, Zhang W, Mu W. Current methods and applications in computational protein design for food industry. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2020;60(19):3259-3270. doi:10.1080/10408398.2019.1682513
54. Lavergne V, Taft RJ, Alewood PF. Cysteine-Rich Mini-Proteins in Human Biology. *Curr Top Med Chem.* 2012;12(14):1514-1533. doi:10.2174/156802612802652411
55. Camarero JA. Cyclotides, a versatile ultrastable micro-protein scaffold for biotechnological applications. *Bioorg Med Chem Lett.* 2017;27(23):5089-5099. doi:10.1016/j.bmcl.2017.10.051
56. Kintzing JR, Cochran JR. Engineered knottin peptides as diagnostics, therapeutics, and drug delivery vehicles. *Curr Opin Chem Biol.* 2016;34:143-150. doi:10.1016/j.cbpa.2016.08.022
57. Kolmar H. Biological diversity and therapeutic potential of natural and engineered cystine knot miniproteins. *Curr Opin Pharmacol.* 2009;9(5):608-614. doi:10.1016/j.coph.2009.05.004
58. Krishna SS, Majumdar I, Grishin NV. Structural classification of zinc fingers. *Nucleic Acids Res.* 2003;31(2):532-550. doi:10.1093/nar/gkg161
59. Xiao S, Bi Y, Shan B, Raleigh DP. Analysis of core packing in a cooperatively folded miniature protein: The ultrafast folding villin headpiece helical subdomain. *Biochemistry.* 2009;48(21):4607-4616. doi:10.1021/bi8021763
60. Ożga K, Berlicki Ł. Design and Engineering of Miniproteins. *ACS Bio Med Chem Au.* 2022;2(4):316-327. doi:10.1021/acsbiomedchemau.2c00008
61. Bejger M, Fortuna P, Drewniak-Świtalska M, Plewka J, Rypniewski W, Berlicki Ł. A computationally designed β -amino acid-containing miniprotein. *Chem Commun.* 2021;57(49):6015-6018. doi:10.1039/d1cc02192c
62. Chiu TK, Kubelka J, Herbst-Irmer R, Eaton WA, Hofrichter J, Davies DR. High-resolution x-ray crystal structures of the villin headpiece subdomain, an ultrafast folding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(21):7517-7522. doi:10.1073/pnas.0502495102
63. Pucheta-Martinez E, D'Amelio N, Lelli M, et al. Changes in the folding landscape of the WW domain provide a molecular mechanism for an inherited genetic syndrome. *Sci Rep.*

2016;6:30293. doi:10.1038/srep30293

64. Chowdhury S, Lee MC, Xiong G, Duan Y. Ab initio folding simulation of the Trp-cage mini-protein approaches NMR resolution. *J Mol Biol.* 2003;327(3):711-717. doi:10.1016/S0022-2836(03)00177-3
65. Hudáky P, Stráner P, Farkas V, Váradi G, Tóth G, Perczel A. Cooperation between a salt bridge and the hydrophobic core triggers fold stabilization in a Trp-cage miniprotein. *Biochemistry.* 2008;47(3):1007-1016. doi:10.1021/bi701371x
66. Regan L, DeGrado WF. Characterization of a helical protein designed from first principles. *Science.* 1988;241(4868):976-978. doi:10.1126/science.3043666
67. Hecht MH, Richardson JS, Richardson DC, Ogden RC. Characterization of Felix: Four-Helix Bundle Protein of Native-Like Sequence. *Science.* 1988;249(4971):884-891.
68. Allouche D, André I, Barbe S, et al. Computational protein design as an optimization problem. *Artif Intell.* 2014;212:59-79. doi:10.1016/j.artint.2014.03.005
69. Dahiyat BI, Sarisky CA, Mayo SL. De novo protein design: Towards fully automated sequence selection. *J Mol Biol.* 1997;273(4):789-796. doi:10.1006/jmbi.1997.1341
70. Cochran AG, Skelton NJ, Starovasnik MA. Tryptophan zippers: stable, monomeric beta-hairpins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(10):5578-5583. doi:10.1073/pnas.091100898
71. Huang PS, Boyken SE, Baker D. The coming of age of de novo protein design. *Nature.* 2016;537(7620):320-327. doi:10.1038/nature19946
72. Kuhlman B, Dantas G, Ireton GC, Varani G, Stoddard BL, Baker D. Design of a novel globular protein fold with atomic-level accuracy. *Science.* 2003;302(5649):1364-1369. doi:10.1126/science.1089427
73. Zhang Z, Chan HS. Competition between native topology and nonnative interactions in simple and complex folding kinetics of natural and designed proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010;107(7):2920-2925. doi:10.1073/pnas.0911844107
74. Buchko GW, Pulavarti SVSRK, Ovchinnikov V, et al. Cytosolic expression, solution structures, and molecular dynamics simulation of genetically encodable disulfide-rich de novo designed peptides. *Protein Sci.* 2018;27(9):1611-1623. doi:10.1002/pro.3453
75. Das R, Baker D. Macromolecular modeling with Rosetta. *Annu Rev Biochem.* 2008;77:363-382. doi:10.1146/annurev.biochem.77.062906.171838
76. Simons KT, Kooperberg C, Huang E, Baker D. Assembly of protein tertiary structures from fragments with similar local sequences using simulated annealing and Bayesian scoring functions. *J Mol Biol.* 1997;268(1):209-225. doi:10.1006/jmbi.1997.0959
77. Alford RF, Leaver-Fay A, Jeliazkov JR, et al. The Rosetta All-Atom Energy Function for Macromolecular Modeling and Design. *J Chem Theory Comput.* 2017;13(6):3031-3048. doi:10.1021/acs.jctc.7b00125
78. Ramachandran GN, Ramakrishnan C, Sasisekharan V. Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *J Mol Biol.* 1963;7(1):95-99. doi:10.1016/S0022-2836(63)80023-6

79. An L, Lee GR. De Novo Protein Design Using the Blueprint Builder in Rosetta. *Curr Protoc Protein Sci.* 2020;102(1):e116. doi:10.1002/cpps.116
80. Lin YR, Koga N, Tatsumi-Koga R, et al. Control over overall shape and size in de novo designed proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(40):E5478-E5485. doi:10.1073/pnas.1509508112
81. Scott LPB, Chahine J, Ruggiero JR. Using genetic algorithm to design protein sequence. *Appl Math Comput.* 2008;200(1):1-9. doi:10.1016/j.amc.2007.09.033
82. Ozawa H, Unno I, Sekine R, Chisuga T, Ito S, Nakano S. Development of evolutionary algorithm-based protein redesign method. *Cell Rep Phys Sci.* 2024;5(1):101758. doi:10.1016/j.xcrp.2023.101758
83. Looger LL, Hellinga HW. Generalized dead-end elimination algorithms make large-scale protein side-chain structure prediction tractable: Implications for protein design and structural genomics. *J Mol Biol.* 2001;307(1):429-445. doi:10.1006/jmbi.2000.4424
84. Georgiev I, Donald BR. Dead-End Elimination with backbone flexibility. *Bioinformatics.* 2007;23(13):i185-i194. doi:10.1093/bioinformatics/btm197
85. Watson JL, Juergens D, Bennett NR, et al. De novo design of protein structure and function with RFdiffusion. *Nature.* 2023;620(7976):1089-1100. doi:10.1038/s41586-023-06415-8
86. Jumper J, Evans R, Pritzel A, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature.* 2021;596(7873):583-589. doi:10.1038/s41586-021-03819-2
87. Dauparas J, Anishchenko I, Bennett N, et al. Robust deep learning–based protein sequence design using ProteinMPNN. *Science.* 2022;378(6615):49-56. doi:10.1126/science.add2187
88. Huang B, Coventry B, Borowska MT, et al. De novo design of miniprotein antagonists of cytokine storm inducers. *Nat Commun.* 2024;15(1):1-11. doi:10.1038/s41467-024-50919-4
89. Boitreau J, Dent J, McPartlon M, et al. Chai-1: Decoding the molecular interactions of life. *bioRxiv.* Preprint published online October 10, 2024. doi:10.1101/2024.10.10.615955
90. Baek M, DiMaio F, Anishchenko I, et al. Accurate prediction of protein structures and interactions using a three-track neural network. *Science.* 2021;373(6557):871-876. doi:10.1126/science.abj8754
91. Ożga K, Berlicki Ł. Miniprotein-Based Artificial Retroaldolase. *ACS Catal.* 2022;12(24):15424-15430. doi:10.1021/acscatal.2c04311
92. Yu WH, Huang PT, Lou KL, Yu SSC, Lin C. A smallest 6 Kda metalloprotease, mini-matrilysin, in living world: A revolutionary conserved zinc-dependent proteolytic domain-helix-loop-helix catalytic zinc binding domain (ZBD). *J Biomed Sci.* 2012;19(1):1-13. doi:10.1186/1423-0127-19-54
93. Moroz YS, Dunston TT, Makhlynets OV, et al. New Tricks for Old Proteins: Single Mutations in a Nonenzymatic Protein Give Rise to Various Enzymatic Activities. *J Am Chem Soc.* 2015;137(47):14905-14911. doi:10.1021/jacs.5b07812
94. Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem.* 2010;31(2):455-

461. doi:10.1002/jcc.21334
95. Der BS, Edwards DR, Kuhlman B. Catalysis by a de novo zinc-mediated protein interface: Implications for natural enzyme evolution and rational enzyme engineering. *Biochemistry*. 2012;51(18):3933-3940. doi:10.1021/bi201881p
 96. Studer S, Hansen DA, Pianowski ZL, et al. Evolution of a highly active and enantiospecific metalloenzyme from short peptides. *Science*. 2018;362(6420):1285-1288. doi:10.1126/science.aau3744
 97. Burton AJ, Thomson AR, Dawson WM, Brady RL, Woolfson DN. Installing hydrolytic activity into a completely de novo protein framework. *Nat Chem*. 2016;8(9):837-844. doi:10.1038/nchem.2555
 98. Ozga K, Rudzinska-Szostak E, Berlicki L. Optimization of peptide foldamer-based artificial retro-aldolase. *Catal Sci Technol*. 2024;14(16):4533-4541. doi:10.1039/d4cy00342j
 99. Ciesiołkiewicz A, Lizandra Perez J, Skalniak L, Nocoń P, Berlicki L. Miniprotein engineering for inhibition of PD-1/PD-L1 interaction. *Protein Sci*. 2024;33(8):e5106. doi:10.1002/pro.5106
 100. Wishart DS, Sykes BD, Richards FM. The Chemical Shift Index: A Fast and Simple Method for the Assignment of Protein Secondary Structure Through NMR Spectroscopy. *Biochemistry*. 1992;31(6):1647-1651. doi:10.1021/bi00121a010
 101. Castello J. Proline-Catalyzed Asymmetric Aldol Reactions between Ketones and α -Unsubstituted Aldehydes. *Org Lett*. 2001;3(4):573-575. doi:10.1021/ol006976y
 102. Trost BM, Brindle CS. The direct catalytic asymmetric aldol reaction. *Chem Soc Rev*. 2010;39(5):1600-1632. doi:10.1039/b923537j
 103. Price JL, Horne WS, Gellman SH. Structural consequences of beta-amino acid preorganization in a self-assembling alpha/beta-peptide: fundamental studies of foldameric helix bundles. *J Am Chem Soc*. 2010;132(35):12378-12387. doi:10.1021/ja103543s
 104. Leman JK, Weitzner BD, Lewis SM, et al. Macromolecular modeling and design in Rosetta: recent methods and frameworks. *Nat Methods*. 2020;17(7):665-680. doi:10.1038/s41592-020-0848-2
 105. Pavlovicz RE, Park H, DiMaio F. Efficient consideration of coordinated water molecules improves computational protein-protein and protein-ligand docking discrimination. *PLoS Comput Biol*. 2020;16(9):e1008103. doi:10.1371/journal.pcbi.1008103
 106. Abramson J, Adler J, Dunger J, et al. Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. *Nature*. 2024;630(8016):493-500. doi:10.1038/s41586-024-07487-w
 107. Case DA, Cerutti DS, Cruzeiro VWD, et al. Recent Developments in Amber Biomolecular Simulations. *J Chem Inf Model*. 2025;65:7835-7843.
 108. Debiec KT, Cerutti DS, Baker LR, Gronenborn AM, Case DA, Chong LT. Further along the Road Less Traveled: AMBER ff15ipq, an Original Protein Force Field Built on a Self-Consistent Physical Model. *J Chem Theory Comput*. 2016;12(8):3926-3947. doi:10.1021/acs.jctc.6b00567
 109. Case DA, Aktulga HM, Belfon K, et al. AmberTools. *J Chem Inf Model*. 2023;63:6183-6191.

110. Greenfield NJ. Using circular dichroism collected as a function of temperature to determine the thermodynamics of protein unfolding and binding interactions. *Nat Protoc.* 2006;1(6):2527-2535. doi:10.1038/nprot.2006.204
111. Lin Y, Barycza B, Rudzińska-Szostak E, Morawiak P, Berlicki Ł. Backbone engineering in the hydrophobic core of villin headpiece. *RSC Chem Biol.* 2025;7(2):226-232. doi:10.1039/d5cb00269a
112. Drewniak-Świtalska M, Barycza B, Rudzińska-Szostak E, Morawiak P, Berlicki Ł. Constrained beta-amino acid-containing miniproteins. *Org Biomol Chem.* 2021;19(19):4272–4278. doi:10.1039/D1OB00309G
113. Lin Y, Home WS. Backbone Modification in a Protein Hydrophobic Core. *Chem Eur J.* 2024;30(45):e202401890. doi:10.1002/chem.202401890