

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.