

STRESZCZENIE

Niniejsza rozprawa doktorska skupia się na wykorzystaniu ligacji enzymatycznej do tworzenia wiązania peptydowego w celu selektywnej i funkcjonalnej semisyntezy i modyfikacji białek. Składają się na nią trzy projekty badawcze o charakterze interdyscyplinarnym i wspólnym celu — rozwoju selektywnych, wydajnych i łagodnych metod do otrzymywania białek i ich koniugatów. W pierwszym z nich zaprezentowano pełne, chemoenzymatyczne otrzymanie metalotioneiny na przykładzie cyjanobakteryjnego białka SmtA przy użyciu ulepszanego wariantu endopeptydazy asparaginowej — OaAEP1_C247A. Opracowana strategia łączyła ze sobą syntezę fragmentów peptydowych na nośniku stałym z enzymatyczną ligacją, prowadząc do otrzymania białka o wysokiej czystości i dobrej wydajności. Produkt końcowy wykazywał identyczne właściwości strukturalne, spektroskopowe i funkcjonalne jak rekombinowany odpowiednik, w tym zdolność do specyficznego wiązania jonów metali bloku d (Zn^{2+} , Cd^{2+}) oraz właściwe fałdowanie. Wyniki te stanowią dowód skuteczności metody chemoenzymatycznej jako alternatywy dla rekombinacyjnej produkcji białek o wymagających sekwencjach, zwłaszcza bogatych w reszty cysteinowe. Druga część pracy dotyczyła opracowania uniwersalnego narzędzia — dwufunkcyjnej sondy SrtCrAsH-EDT₂, umożliwiającej jednoczesne znakowanie fluorescencyjne białek oraz wprowadzenie modyfikacji potranslacyjnych, takich jak ubikwitynacja czy sumoilacja. Strategia ta opiera się na połączeniu enzymatycznej ligacji z udziałem sortazy A oraz specyficznego wiązania sondy bisarsenowej z motywem czterocysteinowym w strukturze białka. Reakcje przebiegały sekwencyjnie w trybie „one-pot” bez konieczności izolacji produktów pośrednich, co znacznie upraszczało i przyspieszało cały proces. Opracowane podejście cechuje się wysoką specyficnością i odwracalnością, co zostało potwierdzone w eksperymentach z modelowymi białkami GST-TC12 i HePTP-4C. Rozwiązanie to otwiera nowe możliwości w badaniach nad dynamiką, lokalizacją i funkcją modyfikacji potranslacyjnych, a także może znaleźć zastosowanie w diagnostyce molekularnej i obrazowaniu komórkowym. W trzecim projekcie opracowano nowy wariant butelazy 1, butelazę AY, który cechuje się znacznie wyższą stabilnością, mniejszą podatnością na agregację oraz uproszczoną procedurą produkcji i aktywacji w porównaniu do typu dzikiego. Butelaza AY wykazuje wysoką aktywność katalityczną oraz szeroką tolerancję względem substratów zawierających zarówno naturalne, jak i nienaturalne reszty aminokwasowe. Umożliwia ona efektywną cyklizację peptydów oraz fluorescencyjne znakowanie białek. Dzięki tym właściwościom stanowi wartościowe narzędzie do modyfikacji biomolekuł, zwłaszcza w warunkach wymagających wysokiej specyficznosci i łagodnych warunków reakcji. W rezultacie opracowane strategie oferują elastyczne, wydajne i selektywne narzędzia do produkcji i modyfikacji białek, szczególnie

takich, których synteza klasycznymi metodami jest utrudniona lub niemożliwa. Uzyskane wyniki mogą znaleźć szerokie zastosowanie w biologii strukturalnej, diagnostyce, obrazowaniu molekularnym i inżynierii biomolekuł.