

## **ZAŁĄCZNIK 3**

# **AUTOREFERAT**

**Dr inż. Danuta Gillner  
Katedra Technologii Chemicznej  
Organicznej i Petrochemii  
Wydział Chemiczny  
Politechnika Śląska  
Gliwice**

**Gliwice, styczeń 2013**

### 1. Imię i Nazwisko

Danuta Gillner\*

### 2. Stopnie naukowe i tytuły zawodowe

- a. 25.05.1990 – magister inżynier - specjalność Technologia Chemiczna Organiczna; Politechnika Śląska w Gliwicach, Wydział Chemiczny (*Temat pracy*: „Badania przebiegu reakcji kondensacji wodoronadtlenku kumenu z dimetylofenylokarbinolem w obecności chlorku cynku jako katalizatora”); Promotor – prof. dr hab. inż. Jan Zawadiak)
- b. 18.02.1998 – doktor nauk technicznych, Politechnika Śląska w Gliwicach, Wydział Chemiczny (*Temat pracy*: „Badania katalitycznej reakcji trzeciorzędowych wodoronadtlenków z węglowodorami”); Promotor – prof. dr hab. inż. Jan Zawadiak)

### 3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu

- a. 1990-1991, asystent-stażysta; Politechnika Śląska w Gliwicach, Wydział Chemiczny, Instytut Chemii i Technologii Organicznej
- b. 1991-1995, asystent; Politechnika Śląska w Gliwicach, Wydział Chemiczny, Instytut Chemii i Technologii Organicznej
- c. 1995-1998, studia doktoranckie, Politechnika Śląska w Gliwicach, Wydział Chemiczny
- d. 03/1998-06/1998, podoktorski staż przemysłowy, Niemcy, Duisburg, Rütgers Kureha Solvents GmbH
- e. 1998-1999, asystent, Politechnika Śląska w Gliwicach, Wydział Chemiczny, Instytut Chemii i Technologii Organicznej
- f. 06/1999-05/2001, postdoctoral fellowship, USA, Utah State University, Chemistry and Biochemistry Department
- g. 2001-2003, adiunkt; Politechnika Śląska w Gliwicach, Wydział Chemiczny, Instytut Chemii i Technologii Organicznej
- h. 2003\*\* -2006, adiunkt; Politechnika Śląska w Gliwicach, Wydział Chemiczny, Katedra Technologii Chemicznej Organicznej i Petrochemii
- i. 10/2006-10/2008, research associate, USA, Loyola University Chicago, Chemistry Department
- j. 2008-nadal, adiunkt; Politechnika Śląska w Gliwicach, Wydział Chemiczny, Katedra Technologii Chemicznej Organicznej i Petrochemii

---

\* W części publikacji pisownia nazwiska – GILNER

\*\* Zmiana nazwy Jednostki

4. Osiągnięcie wynikające z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

*Wybrane metalohydrolazy cynkowe z dwurdzeniowym centrum aktywnym jako potencjalne cele molekularne leków*

#### 4.1 Lista publikacji

Nr	Autorzy, tytuł publikacji, czasopismo, rok wydania	IF
I.	D. M. Gillner, D. Becker, R. C. Holz “Lysine Biosynthesis in Bacteria: A Metallodesuccinylase as a Potential Antimicrobial Target” <i>J. Biol. Inorg. Chem.</i> <b>2012</b> ; DOI 10.1007/s00775-012-0965-1	<b>3,289</b> (2011)
II.	R. C. Holz, A. Starus, D. M. Gillner “Zinc Aminopeptidases: The Aminopeptidase from <i>Vibrio proteolyticus</i> ( <i>Aeromonas proteolytica</i> ) as the Prototypical Enzyme” Rozdział w <i>Encyclopedia of Metalloproteins</i> , V. N. Uversky, R. H. Kretsinger, E. A. Permyakov (eds.), DOI 10.1007/978-1-4614-1533-6, Springer Science+Business Media, LLC 2012	-
III.	B. P. Nocek, D. M. Gillner, Y. Fan, R. C. Holz, A. Joachimiak “Structural Basis for Catalysis by the Mono- and Dimetalated Forms of the <i>dapE</i> -Encoded <i>N</i> -succinyl-Diaminopimelic Acid Desuccinylase” <i>J. Mol. Biol.</i> <b>2010</b> , 397(3), 617-626.	<b>4,008</b>
IV.	J. Hlaváček, J. Pícha, V. Vaněk, J. Jiráček, J. Slaninová, V. Fučík, M. Buděšínský, D. Gilner, R. C. Holz “Inhibitors of <i>N</i> <sup>α</sup> -acetyl-L-ornithine deacetylase: synthesis, characterization and analysis of their inhibitory potency” <i>Amino acids</i> <b>2010</b> , 38, 1155–1164.	<b>4,106</b>
V.	D. M. Gillner, D. L. Bienvenue, B. P. Nocek, A. Joachimiak, V. Zachary, B. Bennett, R. C. Holz. “The <i>dapE</i> -encoded <i>N</i> -succinyl-L,L-diaminopimelic acid desuccinylase from <i>Haemophilus influenzae</i> contains two active-site histidine residues” <i>J. Biol. Inorg. Chem.</i> <b>2009</b> , 14(1), 1-10.	<b>3,415</b>
VI.	D. Gillner, N. Armoush, R. C. Holz, D. P. Becker “Inhibitors of Bacterial <i>N</i> -Succinyl-L,L-diaminopimelic Acid Desuccinylase (DapE) and Demonstration of in vitro Antimicrobial Activity” <i>Bioorg. Med. Chem. Lett.</i> , <b>2009</b> , 19, 6350-6352	<b>2,531</b>

<b>VII.</b>	R. Davis, D. Bienvenue, S. I. Swierczek, D. M. Gilner, L. Rajagopal, R. C. Holz "Kinetic and Spectroscopic Characterization of the E134A- and E134D- Altered <i>dapE</i> -encoded N-succinyl-L,L-Diaminopimelic Acid Desuccinylase from <i>Haemophilus influenzae</i> " <i>J. Biol. Inorg. Chem.</i> , <b>2006</b> , 11, 206-216.	<b>3,303</b>
<b>VIII.</b>	D. L. Bienvenue, D. M. Gilner, R. S. Davis, B. Bennett, R. C. Holz "Substrate Specificity, Metal Binding Properties, and Spectroscopic Characterization of the DapE-Encoded-N-Succinyl-L,L-Diaminopimelic Acid Desuccinylase from <i>Haemophilus influenzae</i> " <i>Biochemistry</i> , <b>2003</b> , 42(36), 10756-10763	<b>3,922</b>
<b>IX.</b>	N. J. Coper, D. L. Bienvenue, J. E. Shokes, D. M. Gilner, T. Tsukamoto, R. A. Scott, R. C. Holz "The <i>dapE</i> -encoded N-Succinyl-L,L-Diaminopimelic Acid Desuccinylase from <i>Haemophilus influenzae</i> Is a Dinuclear Metallohydrolase" <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , <b>2003</b> , 125(48), 14654-14655	<b>6,516</b>
<b>X.</b>	D. L. Bienvenue, D. Gilner, R. C. Holz "Hydrolysis of Thiono-peptides by the Aminopeptidase from <i>Aeromonas proteolytica</i> : Insight into Substrate Binding" <i>Biochemistry</i> , <b>2002</b> , 41(11), 3712-3719	<b>4,064</b>
	<b>Suma IF cyklu publikacji</b>	<b>35,154</b>

## 4.2 Omówienie celu naukowego wyżej wymienionych prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

### *Cel naukowy pracy*

Przedstawiony cykl publikacji zawiera wyniki badań trzech wybranych metaloenzymów cynkowych: *dapE*-kodowanej hydrolazy bursztynianowej kwasu *N*-bursztynilo-L,L-2,6-diaminopimelinowego z *Haemophilus influenzae* (oznaczenie DapE), *argE*-kodowanej deacetylazy *N*-acetylo-L-ornityny z *Escherichia coli* (oznaczenie ArgE) oraz aminopeptydazy leucynowej z *Vibrio proteolyticus* (*Aeromonas proteolytica*) (oznaczenie AAP). Dwa pierwsze enzymy uczestniczą w szlakach biosyntezy ważnych aminokwasów *mezo*-diaminopimelinianu i lizyny (DapE) oraz argininy (ArgE) w organizmach drobnoustrojów. Ze względu na fakt, że omawiane ścieżki biosyntezy nie występują u ssaków, enzymy te stanowią dobry cel molekularny dla nowych leków przeciwdrobnoustrojowych. Efektywne inhibitory jednego lub kilku enzymów uczestniczących w szlakach biosyntezy lizyny lub argininy mogłyby wykazywać selektywną

toksyczność w stosunku do drobnoustrojów, przy niewielkim wpływie na organizm człowieka [1].

Aminopeptydaza leucynowa z *Vibrio proteolyticus* (AAP) z kolei, ze względu na swoją budowę, dostępność i właściwości, jest idealnym modelem do badań zależności pomiędzy strukturą a funkcją oraz badań mechanistycznych bardzo ważnej grupy dicynkowych metalopeptydaz.

Zasadnicza część publikacji (Publikacje I, III, V-IX) dotyczy pierwszego z wymienionych enzymów - *dapE*-kodowanej hydrolazy bursztynianowej kwasu *N*-bursztynylo-L,L-2,6-diaminopimelinowego z *Haemophilus influenzae* (oznaczenie DapE). **Celem badań DapE** było poznanie struktury krystalicznej, budowy centrum aktywnego, określenie specyficzności substratowej, roli metali i poszczególnych aminokwasów w samym centrum aktywnym oraz w jego otoczeniu, co w konsekwencji pozwoliło na zaproponowanie mechanizmu działania DapE oraz wytypowanie i syntezę związków, które mogą być potencjalnymi inhibitorami. Kilka prostych związków posiadających w swojej strukturze grupy wiążące cynk tzw. ZBG (*ang.* zinc binding groups), wykazało aktywność inhibującą w stężeniach na poziomie mikromolowym. W przyszłości, mogą one posłużyć jako syntony bardziej złożonych układów.

**Kolejnym celem badawczym** było wytypowanie, spośród otrzymanych analogów substratu, jak również handlowych związków zawierających ZBG, inhibitorów podobnego enzymu - *argE*-kodowanej deacetylazy *N*-acetylo-L-ornityny (ArgE) (Publikacja IV).

W przypadku **aminopeptydazy leucynowej z *Vibrio proteolyticus*** celem było wyjaśnienie mechanizmu katalitycznego, a szczególnie etapu wiązania substratu z enzymem, z wykorzystaniem analogów substratu, w których tlen grupy karbonylowej zastąpiono siarką (Publikacje II, X).

## ***Wprowadzenie***

W ostatnich latach bardzo często pojawiają się niepokojące informacje na temat rosnącej oporności drobnoustrojów na istniejące leki [2]. Większość dostępnych obecnie leków przeciwdrobnoustrojowych działa na stosunkowo małą liczbę celów molekularnych, hamując proces budowy ściany komórkowej lub syntezę białek swoistych dla

- 
1. Scapin G., Blanchard J.S. Enzymology of bacterial lysine biosynthesis. *Adv. Enzymol.* **1998**, 72, 279-325.
  2. Bartlett J.G. The 10x20 Initiative: Pursuing a Global Commitment to Develop 10 New Antibacterial Drugs by 2020. *Clinical Infectious Diseases* **2010**, 50, 1081–1083; Coates A.R.M.; Halls G.; Hu Y. Novel classes of antibiotics or more of the same? *British Journal of Pharmacology*, **2011**, 163, 184-194; Gould I.M. *Int. J. Antimicrob. Agents*, **2010**, 36 S3, S1-2.

mikroorganizmów [3]. Biorąc pod uwagę fakt, że każdy z tych leków, atakujący konkretny cel molekularny, posiada ograniczoną „żywołność” ze względu na wypracowywaną przez drobnoustroje oporność, opracowanie nowych inhibitorów, ale przede wszystkim znalezienie nowych celów molekularnych, jest niezwykle ważne z punktu widzenia kontroli nad chorobami infekcyjnymi [4, 5]. W tym świetle, przedstawione w niniejszej pracy wyniki wpisują się bardzo dobrze w obecne trendy badawcze.

Metalohydrolazy cynkowe posiadające dwurdzeniowe centrum aktywne odgrywają kluczową rolę w najważniejszych procesach życiowych. Katalizują one różnorodne reakcje z udziałem ważnych fizjologicznie cząsteczek, takich jak polipeptydy, hormony i białka. Posiadają również zdolność do oddziaływania z kwasami nukleinowymi i antybiotykami. Enzymy te pełnią ważną rolę w wielu procesach obronnych i chorobotwórczych (w chorobach takich jak: udar mózgu, cukrzyca, nowotwory, infekcja wirusem HIV, infekcje bakteryjne, schizofrenia, katarakta, malaria). Ze względu na rolę, jaką odgrywają w organizmach żywych, istnieje konieczność poznania ich struktury, funkcji i mechanizmu działania. Omawiane enzymy są również obiektem intensywnych badań, w których stanowią cele molekularne dla projektowanych inhibitorów.

Wśród metalohydrolaz należących do tej grupy wymienić można m.in. aminopeptydazy leucynowe z *Vibrio proteolyticus* (dawniej *Aeromonas proteolytica*, AAP) czy z *Streptomyces griseus* (SAP), tetraedryczną aminopeptydazę (TET) i D-aminopeptydazy (DppA). Kolejnymi enzymami są karboksypeptydaza G<sub>2</sub> z *Pseudomonas sp.* szczep RS-16 (CPG<sub>2</sub>), *dapE*-kodowana hydrolaza bursztynianowa kwasu *N*-bursztynilo-L,L-2,6-diaminopimelinowego (DapE), *argE*-kodowana deacetylaza *N*-acetylo-L-ornityny (ArgE) i karboksypeptydaza glutaminowa II (GCP-II) [6]. We wszystkich tych enzymach centrum aktywne jest zbudowane z podobnego zestawu aminokwasów, zdolnych do wiązania dwóch jonów Zn(II), a w opisanych strukturach potwierdzono obecność rdzenia (μ-akwa)(μ-karboksylano)dicynkowego(II).

---

3. Henry C.M. The specter of antibiotic resistance has engaged pharmaceutical and biotechnology companies to seek new weapons to battle infections. *C&E News* **2000**, 78(10), 41-58.

4. Teuber M. Spread of antibiotic resistance with food-borne pathogens. *Cell. Mol. Life Sci.* **1999**, 56, 755-763.

5. Miller J.R., Dunham S., Mochalkin I., Banotai C., Bowman M., Buist S., Dunkle B., Hanna D., Harwood H.J., Huband M.D., Karnovsky A., Kuhn M., Limberakis C., Liu J.Y., Mehrens S., Mueller W.T., Narasimhan L., Ogden A., Ohren J., Prasad J.V., Shelly J.A., Skerlos L., Sulavik M., Thomas V.H., VanderRoest S., Wang L., Wang Z., Whitton A., Zhu T., Stover C.K. A class of selective antibacterials derived from a protein kinase inhibitor pharmacophore. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2009**, 106, 1737-1742.

6. Holz R.C., Starus A., Gillner D.M. Zinc Aminopeptidases: The Aminopeptidase from *Vibrio proteolyticus* (*Aeromonas proteolytica*) as the Prototypical Enzyme; *Encyclopedia of Metalloproteins* **2012**, Uversky V.N., Kretsinger R.H., Permyakov E.A. (eds.), DOI 10.1007/978-1-4614-1533-6, Springer Science+Business Media, LLC (**Publikacja Nr II**).

Prace nad metalohydrolazami cynkowymi (głównie AAP i DapE) rozpoczęłam w 1999 roku, na stażu podoktorskim w Stanach Zjednoczonych, w Utah State University, Logan, UT, w grupie profesora Richarda Holza. Badania dotyczyły zarówno aspektów biochemicznych (hodowla bakterii, izolacja i oczyszczanie enzymów, otrzymywanie apo-enzymów i próbek z różnymi metalami, badania kinetyczne, inhibicyjne oraz badania spektroskopowe mające na celu wyjaśnienie mechanizmu działania enzymu) jak i chemicznych (synteza wielu związków, substratów i analogów substratów do badań kinetycznych i inhibicyjnych). Po powrocie do Polski w roku 2001 kontynuowałam prace badawcze w tym obszarze. Dzięki temu zakres badań nad budową i mechanizmem działania DapE został znacznie rozszerzony, czego dowodem są **publikacje VII-X**. Kolejny dwuletni pobyt w Loyola University Chicago w latach 2006-2008 roku (w grupie prof. Holza oraz we współpracy z prof. Danielem Beckerem) pozwolił mi na kontynuację i sprecyzowanie dodatkowych koncepcji badawczych oraz uzyskanie bardzo ciekawych wyników dotyczących struktury, funkcji poszczególnych aminokwasów w centrum aktywnym oraz selekcji grupy związków będących inhibitorami DapE i ArgE. Współpraca z tym ośrodkiem jest nadal kontynuowana (**Publikacje I-VI**). W publikacji przeglądowej (**Publikacja I**) przedstawiłam uzyskane dotychczas wyniki związane z DapE.

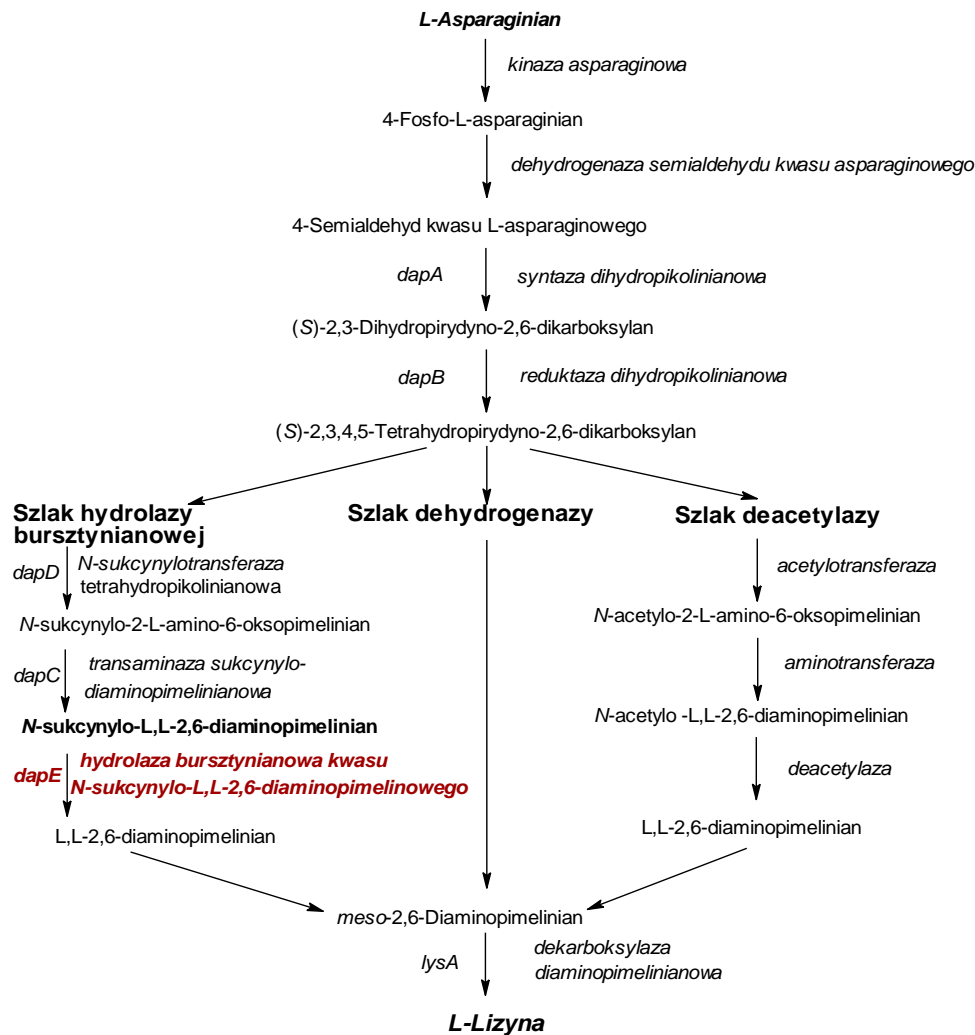
Badania inhibicyjne rozszerzone zostały o podobny enzym - deacetylazę ornitynową – ArgE (**Publikacja IV**). W przypadku kolejnego metaloenzymu – aminopeptydazy leucynowej z *Aeromonas (Vibrio) proteolytica* (AAP), ciekawe wyniki, wyjaśniające etap wiązania substratu z enzymem, uzyskałam w badaniach szeregu analogów substratu, w których tlen grupy karbonylowej zastąpiłam siarką (**Publikacja X**). Przegląd dotychczas przeprowadzonych badań nad AAP, w postaci rozdziału w *Encyclopedia of Metalloproteins* (**Publikacja II**) pozwolił z kolei na bardziej szczegółową charakterystykę tego enzymu oraz zaproponowanie mechanizmu hydrolizy opartej na dyskusji możliwych (opartych na wynikach doświadczalnych) ścieżek przemian.

## **Wyniki**

### **DapE-kodowana hydrolaza bursztynianowa kwasu N-bursztynylo-L,L-2,6-diaminopimelinowego z *Haemophilus influenzae* (E.C. 3.5.1.18) (DapE)**

DapE-kodowana hydrolaza bursztynianowa kwasu N-bursztynylo-L,L-2,6-diaminopimelinowego z *Haemophilus influenzae* uczestniczy w ścieżce biosyntezy lizyny z asparaginianu.

Lizyna jest jednym z ważnych aminokwasów egzogennych, które nie są syntetyzowane w organizmie ludzkim. Konieczne jest więc dostarczenie jej ze składnikami pokarmowymi. W przeciwieństwie do ssaków, bakterie i rośliny posiadają zdolność biosyntezy tego cennego związku. Dane literaturowe wskazują, że w jednym z etapów biosyntezy lizyny (Rysunek 1), tworzy się równie ważny związek – *mezo*-diaminopimelinian (*mDAP*) – składnik budulcowy ściany komórkowej [1, 7, 8].



Rysunek 1. Szlak biosyntezy kwasu *mezo*-2,6-diaminopimelinowego i lizyny u bakterii [9].

7. Born T.L., Blanchard J.S. Structure/function studies on enzymes in the diaminopimelate pathway of bacterial cell wall synthesis. *Cur. Opin. Chem. Biol.* **1999**, 3, 607-613.
8. Girodeau J.-M., Agouridas C., Masson M., Pineau R., LeGoffic F. The lysine pathway as a target for a new genera of synthetic antibacterial antibiotics? *J. Med. Chem.* **1986**, 29, 1023-1030.
9. Born T.L., Zheng R., Blanchard J.S. Hydrolysis of *N*-succinyl-L,L-diaminopimelic acid by the *Haemophilus influenzae* dapE-encoded desuccinylase: metal activation, solvent isotope effects, and kinetic mechanism. *Biochemistry* **1998**, 37, 10478-10487.



Na etapie (S)-2,3,4,5-tetrahydropirydino-2,6-dikarboksylanu możliwe są trzy alternatywne drogi biosyntezy lizyny i *mezo*-diaminopimelinianu [1, 7, 9]: ścieżka hydrolazy bursztynianowej, dehydrogenazy i deacetylazy. Obecność trzech dróg potwierdza ważność *mDAP* i lizyny dla drobnoustrojów. Ścieżka hydrolazy bursztynianowej jest główną, występującą u wszystkich Gram-ujemnych i wielu Gram-dodatnich bakterii. U większości bakterii występuje tylko jedna z trzech ścieżek biosyntezy lizyny. Wyjątkiem są nieliczne bakterie Gram-dodatnie (m.in. *Corynebacterim glutamicum*, *Bacillus brevis*, *Bacillus cereus* czy *Bacillus licheniformis*), które są zdolne do stosowania zarówno ścieżki hydrolazy bursztynianowej jak i dehydrogenazy [10].

Kolejnym dowodem na kluczową rolę DapE w procesie biosyntezy *mDAP* i lizyny jest fakt, że usunięcie genu *dapE*, kodującego hydrolazę bursztynianową kwasu *N*-bursztynylo-L,L-2,6-diaminopimelinowego prowadzi do śmierci komórek bakteryjnych *Helicobacter pylori* i *Mycobacterium smegmatis* [11, 12], nawet w przypadku hodowli bakterii w środowisku, do którego doda się lizyny. Wskazuje to wyraźnie, że w przypadku usunięcia genu *dapE* lizyna nie może być syntetyzowana inną drogą, bądź też dostarczana z zewnątrz.

*DapE*-kodowana hydrolaza bursztynianowa kwasu *N*-bursztynylo-L,L-2,6-diaminopimelinowego została wyizolowana z wielu źródeł, a geny zidentyfikowane w dużej liczbie patogennych Gram-dodatnich i Gram-ujemnych bakterii, m.in. *Yersinia pestis*, *Vibrio Cholerae*, *Bacillus anthracis*, *E. coli* 0157:H7, *Shigella flexneri*, *Salmonella typhimurium*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bordetella pertussis*, *Staphylococcus aureus* (szczep MRSA252), *Rickettsia prowazekii*, *Helicobacter pylori*, *Haemophilus influenzae*, *Enterococcus faecium*, *Streptococcus pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* (MRAB) i *Mycobacterium tuberculosis* [13].

---

10. Velasco A.M., Leguina J.I., Lazcano A. Molecular evolution of the lysine biosynthetic pathways. *J. Mol. Evol.* **2002**, 55, 445-459.

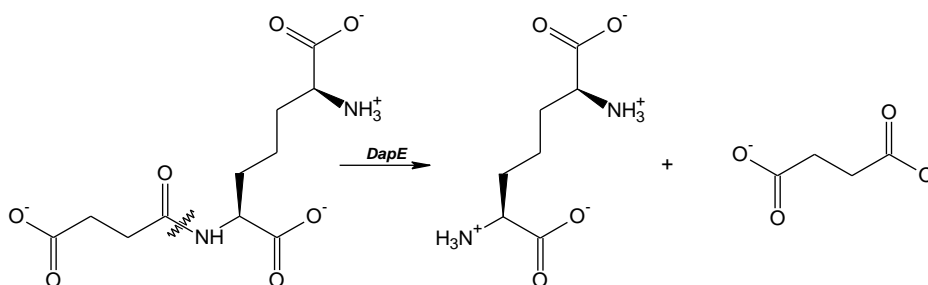
11. Karita M., Etterbeek M.L., Forsyth M.H., Tummuru M.R., Blaser M.J. Characterization of *Helicobacter pylori* *dapE* and construction of a conditionally lethal *dapE* mutant. *Infect. Immun.* **1997**, 65, 4158-4164.

12. Pavelka M.S., Jacobs W.R. Biosynthesis of diaminopimelate, the precursor of lysine and a component of peptidoglycan, is an essential function of *Mycobacterium smegmatis*. *J. Bacteriol.* **1996**, 178, 6496-6507.

**13. Gillner D.M., Becker D., Holz R.C.** Lysine Biosynthesis in Bacteria: A Metallodesuccinylase as a Potential Antimicrobial Target. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2012**; DOI 10.1007/s00775-012-0965-1 (**Publikacja Nr I**).

Charakterystyka *dapE*-kodowanej hydrolazy bursztynianowej kwasu *N*-bursztynylo-L,L-2,6-diaminopimelinowego (*DapE*) z *Haemophilus influenzae* (Publikacje V, VI, VIII)

Hydrolaza bursztynianowa z *Haemophilus influenzae* (rekombinowana i nadekspresjonowana w komórkach *E. coli*) jest dimerycznym enzymem, o masie cząsteczkowej 41 350 – 41 500 Da/monomer [14]. Katalizuje ona hydrolizę wiązania amidowego w kwasie *N*-bursztynylo-L,L-2,6-diaminopimelinowym (Rysunek 2), z utworzeniem L,L-2,6-diaminopimelinianu i reszty kwasu bursztynowego.



Rysunek 2. Hydroliza kwasu *N*-bursztynylo-L,L-2,6-diaminopimelinowego (L,L-SDAP) katalizowana DapE.

W badaniach specyficzności substratowej DapE z *Haemophilus influenzae* [14], zastosowałam wszystkie stereoizomery kwasu *N*-bursztynylo-2,6-diaminopimelinowego (SDAP), które wcześniej syntetyzowałam i rozdzieliłam. Do rozdzielania stereoizomerów surowca zastosowałam selektywną krystalizację kwasu 2,6-diaminopimelinowego (DAP) z kwasem 2-naftalenosulfonowym (oddzielenie mieszaniny L,L- i D,D-DAP). W reakcji DAP z bezwodnikiem bursztynowym otrzymałam mieszaninę D,D- i L,L-SDAP, którą rozdzielałam opierając się na opublikowanej wcześniej metodzie, z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej, z zastosowaniem chiralnej kolumny Chirobiotic T [9]. Zmodyfikowanie tej metody (zastosowanie izokratycznej mieszaniny 20% metanolu w wodzie; pH 4) pozwoliło na uzyskanie dobrego rozdzielania izomerów.

Kolejną grupą związków testowanych w ramach badań specyficzności substratowej DapE, były acetylowane pochodne różnych L-aminokwasów, posiadających łańcuchy boczne podobne do kwasu diaminopimelinowego (*N*-acetyloglutaminian, *N*-acetyloglutaminę, *N*-acetyloargininę, *N*-acetylolizynę, *N*-acetyloornitynę) oraz *N*-bursztynylo-2-aminopimelinian różniący się od substratu natywnego brakiem grupy aminowej w łańcuchu

14. Bienvenue D.L., Gilner D.M., Davis R.S., Bennett B., Holz R.C. Substrate Specificity, Metal Binding Properties, and Spectroscopic Characterization of the DapE-Encoded *N*-Succinyl-L,L-Diaminopimelic Acid Desuccinylase from *Haemophilus influenzae*. *Biochemistry* **2003**, 42, 10756-10763 (Publikacja Nr VIII).

bocznym. Zastosowałam również kilka *N*-acylowych pochodnych kwasu diaminopimelinowego (*N*-acetylo-, *N*-glutarylo-, *N*-3,3-dimetylo-glutarylo-, *N*-fumarylo-), dostarczonych przez grupę badawczą z Instytutu Chemii Organicznej i Biochemii, Czeskiej Akademii Nauk [15, 16].

W stosowanych warunkach, spośród wszystkich badanych związków jedynie forma L,L-SDAP była hydrolizowana wobec DapE [ $\text{ZnZn}(\text{DapE})$ ]:  $k_{\text{kat}}/K_{\text{m}}$  11400  $\text{mM}^{-1}\text{min}^{-1}$ ; [ $\text{Zn}(\text{DapE})$ ]:  $k_{\text{kat}}/K_{\text{m}}$  6600  $\text{mM}^{-1}\text{min}^{-1}$ ). Jednocześnie wykazałam, że D,D-SDAP nie jest hydrolizowany i nie wpływa na aktywność enzymu w procesie hydrolizy L,L-SDAP, co pozwoliło na zastosowanie w niektórych badaniach kinetycznych kwasu *N*-bursztynilo-2,6-diaminopimelinowego w postaci mieszaniny form L,L- D,D- w stosunku molowym 50:50, bez dodatkowego rozdzielania stereoisomerów D,D- i L,L- na kolumnie chiralnej.

Uzyskane wyniki świadczą o wysokiej substrato-, ale także stereospecyficzności badanego enzymu. Wskazują również, że poszczególne grupy w aminokwasie jak i reszcie *N*-acylowej substratu ściśle oddziałują z centrum aktywnym DapE, dlatego ważna jest zarówno jego budowa jak i długość łańcucha.

Opisane w literaturze wcześniejsze badania DapE z *Haemophilus influenzae* wykazały, że produkty hydrolizy *N*-bursztynilo-L,L-2,6-diaminopimelinianu są słabymi, bądź bardzo słabymi inhibitorami kompetycyjnymi tego enzymu. Wartości  $K_i$  dla izomerów kwasu 2,6-diaminopimelinowego wynoszą odpowiednio 8 mM dla L,L-DAP, 12 mM dla D,L-DAP oraz 90 mM dla D,D-DAP. W przypadku kwasu bursztynowego, dopiero przy stężeniu 100 mM obserwowano bardzo słabą inhibicję [9].

Tak wysoka specyficzność substratowa badanego enzymu daje nadzieję, że selektywne inhibitory zaprojektowane dla DapE nie będą wpływały na działanie enzymów obecnych w organizmach ssaków, a szczególnie człowieka.

W celu określenia aktywności DapE z *Haemophilus influenzae* z różnymi metalami [14], apo-enzym inkubowałam z odpowiednimi ilościami soli Mn(II), Mg(II), Co(II), Ni(II), Cu(II), Zn(II), Cd(II), a następnie wyznaczyłam zależność stałej  $k_{\text{kat}}$  reakcji hydrolizy substratu (zastosowałam mieszaninę D,D- L,L-SDAP) od stężenia jonów poszczególnych metali. Wartości  $k_{\text{kat}}$  dla enzymu z poszczególnymi metalami w centrum aktywnym układały się w następującym szeregu: Co(II)>Zn(II)>Cd(II)>Mn(II)>Ni(II)~Cu(II)~Mg(II). DapE

---

15. Vaněk V., Pícha J., Buděšínský M., Šanda M., Jiráček J., Holz R. C., Hlaváček J. Synthesis of *N*-Succinyl-L,L-Diaminopimelic Acid Mimetics Via Selective Protection. *Protein Pept. Lett.* **2010**, 17, 405-409.

16. Hlaváček J., Pícha J., Vaněk V., Jiráček J., Slaninová J., Fucik V., Gilner D., Holc R. C. Analogues of Orn and DAP as potential inhibitors of bacterial enzymes ArgE and DapE. *Collection Symposium Series*, **2009**, 11Biologically Active Peptides, 43-46.

aktywowana jonami Co(II) wykazywała znacznie wyższą aktywność w porównaniu z natywnym enzymem zawierającym Zn(II). Ciekawe było również uzyskanie aktywności DapE z jonami miedzi(II) w centrum aktywnym, co jest rzadko spotykanym zjawiskiem dla enzymów cynkowych. Aktywność DapE z tak szerokim spektrum metali może sugerować ważność tego enzymu dla bakterii. Nawet w środowisku ubogim w jony cynku(II), synteza ściany komórkowej nie zostanie zakłócona.

Na podstawie miareczkowania apo-DapE jonami Zn(II), wykazaliśmy, że już po dodaniu 1 ekwiwalentu Zn(II) enzym wykazuje 80% swojej maksymalnej specyficznej aktywności (SA dla [Zn\_(DapE)] 150U/mg; dla [ZnZn(DapE)] 180 U/mg). Sugeruje to, że jon metalu w pierwszym miejscu wiązania pełni główną rolę w procesie katalitycznym. Kolejne badania roli metali w poszczególnych miejscach wiązania pozwoliły na stwierdzenie, że wartość  $K_m$  dla próbki ZnCoDapE jest znacznie niższa w porównaniu z [ZnZn(DapE)] (odpowiednio 0,26 i 0,73mM), co sugeruje, że również drugi metal spełnia ważną rolę polegającą najprawdopodobniej na wiązaniu i odpowiednim ułożeniu substratu. Na podstawie wyników miareczkowania obliczona została również stała dysocjacji  $K_d=0,14\mu\text{M}$  dla Zn(II) w pierwszym miejscu wiązania. Dalsze badania DapE (aktywowanego jonami Co(II)), metodą elektronowej spektroskopii absorpcyjnej, pozwoliły na wysunięcie wstępnych wniosków dotyczących geometrii koordynacji (pierwsze miejsce – geometria zniekształcona tetraedryczna; drugie - oktaedryczna). Dane uzyskane w tych badaniach posłużyły także do obliczenia  $K_d$  dla drugiego atomu centralnego Co(II) w miejscu aktywnym ( $K_d=300\mu\text{M}$ ). Tak znaczna różnica w stałych dysocjacji wskazuje, że pierwszy jon metalu jest znacznie ściślej związany z centrum aktywnym enzymu. W badaniach wpływu temperatury na aktywność [ZnZn(DapE)] w zakresie 289-308K wyznaczone zostały wartości energii aktywacji ( $E_a$  31 kJ/mol) oraz entalpia (28,5 kJ/mol; w 25°C), entropia (-119 J/mol; w 25°C) oraz energia swobodna aktywacji (64 kJ/mol; w 25°C).

Celem dalszej części badań było wytypowanie aminokwasów będących ligandami jonów metali w centrum aktywnym DapE [17]. W tym czasie nie dysponowaliśmy jeszcze strukturą enzymu, więc porównane zostały sekwencje aminokwasów DapE z różnych organizmów oraz wybranych dwurdzeniowych metalohydrolaz cynkowych m.in. karboksypeptydazy z *Pseudomonas sp.* szczep RS-16 (CPG2) czy *argE*-kodowanej

---

17. Gillner D.M., Bienvenue D.L., Nocek B.P., Joachimiak A., Zachary V., Bennett B., Holz R.C. The dapE-encoded *N*-succinyl-L,L-diaminopimelic acid desuccinylase from *Haemophilus influenzae* contains two active site histidine residues. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2009**, 14, 1-10 (Publikacja Nr V).

deacetylazy ornitynowej z *Escherichia coli*. Dopasowanie sekwencji genów kilku DapE wyizolowanych z różnych organizmów wykazało, że są one w co najmniej 49% identyczne.

Porównanie sekwencji stało się podstawą do zaproponowania histydyny 67 i 349 jako ligandów jonów cynku(II) w centrum aktywnym DapE. W celu potwierdzenia tej hipotezy, otrzymane zostały formy DapE, w których H67 lub H349 zastąpione zostały alaniną [17]. Wartość  $k_{\text{kat}}/K_M$  zmutowanego enzymu H67A DapE obniżyła się 180-cio krotnie. Enzym H349A DapE nie wykazywał żadnej aktywności katalitycznej w badanych warunkach. Analizy EPR (we współpracy z prof. B. Bennettem z Medical College of Wisconsin, WI, USA) i UV-VIS zmutowanych enzymów, z jonami kobaltu(II) w centrum aktywnym, potwierdziły przyporządkowanie H67 jako ligandu w pierwszym miejscu wiązania jonu metalu, a H349 jako ligandu drugiego jonu metalu. Widmo UV-VIS formy H67A\_DapE po dodaniu jednego ekwiwalentu Co(II), znacznie różniło się od tego jakie otrzymano dla natywnej [Co\_(DapE)], było natomiast bardzo podobne do tego, jakie otrzymałam dla drugiego miejsca wiązania metalu w formie natywnej. Widma H349A DapE z kolei były analogiczne jak w przypadku mono-kobaltowej formy natywnej DapE.

Dodatkowe potwierdzenie uzyskaliśmy również w wyniku homologicznego modelowania DapE z *Haemophilus influenzae* (we współpracy z grupą prof. A. Joachimiaka z Argonne National Laboratory, IL, USA), w oparciu o znaną strukturę apo-DapE z *Neisseria meningitidis*. W wyniku nałożenia tak uzyskanego modelu na strukturę [ZnZn(AAP)] stwierdziliśmy, że w obszarze  $\sim 4 \text{ \AA}$  wokół miejsc wiązania Zn(II) wszystkie reszty aminokwasów są prawie identyczne. Jediną różnicą było odwrotne przyporządkowanie reszt histydynowych do poszczególnych miejsc wiązania atomów centralnych Zn(II).

Zaproponowaliśmy również, że kwas glutaminowy 134 (E134) spełnia rolę kwasu/zasady Brönsteda w procesie katalizy [18]. W celu udowodnienia tej hipotezy otrzymane zostały dwie formy DapE, gdzie kwas glutaminowy zastąpiono odpowiednio alaniną (E134A) lub kwasem asparaginowym (E134D). W przypadku E134D DapE wartość stałej Michaelisa nie uległa znaczącej zmianie, natomiast znacznemu obniżeniu uległa wartość  $k_{\text{kat}}$  (około 1000 razy niższa dla E134D). W przypadku zastąpienia kwasu glutaminowego alaniną, która nie ma zdolności transferu protonu, nie obserwowano aktywności enzymu w badanych warunkach. Aktywacja Apo-E134D DapE jonami dwuwartościowych metali przejściowych wykazała, że forma [CoCo(DapE)] jest około

---

18. Davis R., Bienvenue D., Swierczek S.I., Gilner D.M., Rajagopal L., Holz R.C. Kinetic and spectroscopic characterization of the E134A- and E134D-altered dapE-encoded N-succinyl-L,L-diaminopimelic acid desuccinylase from *Haemophilus influenzae*. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2006**, 11, 206-216 (Publikacja Nr VII).

dwukrotnie bardziej aktywna niż natywna forma z atomami centralnymi Zn(II). Wartości obserwowanej  $k_{\text{kat}}$  dla enzymu E134D DapE układały się w następującym szeregu Co(II)>Zn(II)>Cd(II)>Mn(II). W przeciwieństwie do enzymu natywnego nie zaobserwowaliśmy natomiast aktywności E134D DapE z jonami Ni(II), Cu(II) czy Mg(II) w centrum aktywnym. Rola E134 jako kwasu/zasady Brönsteda polega więc na deprotonowaniu cząsteczki wody łączącej jony metali w centrum aktywnym, co prowadzi do utworzenia bardziej nukleofilowej reszty hydroksylowej (centrum aktywne DapE, rysunek 5B, str. 16). Oderwany proton jest przyłączany przez nowo utworzoną resztę aminową w produkcji hydrolizy.

### Struktura krystaliczna DapE

Głównym ograniczeniem w projektowaniu i syntezie inhibitorów DapE na początku prowadzonych przez nas badań, był brak jej struktury krystalicznej. Opisana w literaturze struktura DapE z *N. meningitidis* nie dostarczała informacji na temat lokalizacji jonów metali w centrum aktywnym, gdyż była to jedynie struktura apo-enzymu [19].

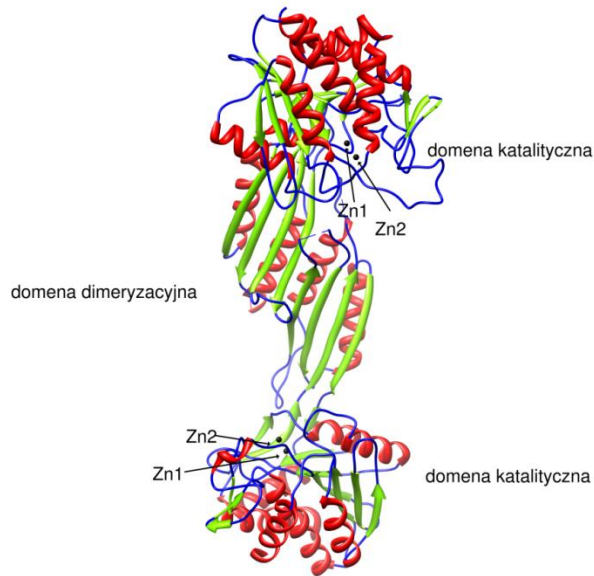
Dzięki wprowadzonej przeze mnie modyfikacji procesu oczyszczania enzymu, a następnie doborowi warunków krystalizacji (we współpracy z dr Bogusławem Nockiem), rozwiązaliśmy strukturę krystaliczną dwóch form DapE z *H. influenzae*: monocynkowej [Zn\_(DapE)] oraz dicynkowej [ZnZn(DapE)], z rozdzielczością odpowiednio 2,0 i 2,3 Å [20].

DapE z *H. influenzae* ma postać homodimeru, gdzie każdy monomer składa się z dwóch domen: dużej domeny katalitycznej zawierającej m.in. ligandy cynku(II) i mniejszej domeny dimeryzacyjnej (Rysunek 4). Kształt dimeru przypomina skręconą słuchawkę telefonu.

---

19. Badger J., Sauder J.M., Adams J.M., Antonysamy S., Bain K., Bergseid M.G., Buchanan S.G., Buchanan M.D., Batiyenko Y., Christopher J.A., Emtage S., Eroshkina A., Feil I., Furlong E.B., Gajiwala K.S., Gao X., He D., Hendle J., Huber A., Hoda K., Kearins P., Kissinger C., Laubert B., Lewis H.A., Lin J., Loomis K., Lorimer D., Louie G., Maletic M., Marsh C.D., Miller I., Molinari J., Muller-Dieckmann H.J., Newman J.M., Noland B.W., Pagarigan B., Park F., Peat T.S., Post K.W., Radojicic S., Ramos A., Romero R., Rutter M.E., Sanderson W.E., Schwinn K.D., Tresser J., Winhoven J., Wright T.A., Wu L., Xu J., Harris T.J. Structural analysis of a set of proteins resulting from a bacterial genomics project. *Proteins* **2005**, 60, 787-796.

20. Nocek B.P., Gillner D.M., Fan Y., Holz R.C., Joachimiak A. Structural basis for catalysis by the mono- and dimetalated forms of the *dapE*-encoded *N*-succinyl-L,L-diaminopimelic acid desuccinylase. *J. Mol. Biol.* **2010**, 397, 617-626 (**Publikacja Nr III**).

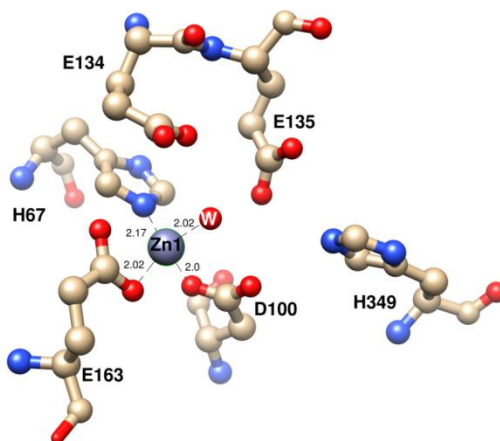


Rysunek 4. Struktura krystalograficzna hydrolazy bursztynianowej kwasu *N*-bursztynnylo-L,L-2,6-diaminopimelinowego z *Haemophilus influenzae* (PDB 3IC1) (program Chimera [21])

Domena katalityczna składa się z domeny globularnej  $\alpha/\beta$  ze skreconym, złożonym z  $\beta$ -harmonijek rdzeniem hydrofobowym, znajdującym się pomiędzy siedmioma  $\alpha$ -helisami. W środku domeny katalitycznej, powyżej równolegle umieszczonych  $\beta$ -harmonijek znajduje się, przykryte pętlami, centrum aktywne.

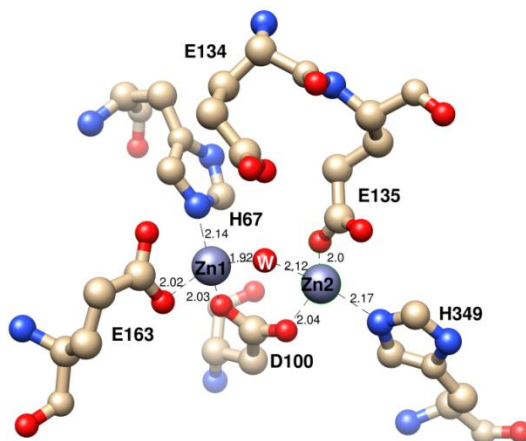
Dużym osiągnięciem było rozwiązanie przez nas struktury krystalicznej monocynkowej formy ( $[Zn_{\text{DapE}}]$ ) [20]. Potwierdziliśmy dotychczas opisane wyniki badań kinetycznych i spektroskopowych kilku metalohydrolaz dwurdzeniowych, świadczących o tym, że zachowują one aktywność z jednym tylko atomem centralnym metalu w centrum aktywnym. Pozwoliło to także na dokładne ustalenie, które miejsce jest odpowiedzialne za wiązanie pierwszego atomu centralnego cynku(II). Atom centralny Zn1(II), o zniekształconej tetraedrycznej strukturze koordynacyjnej, jest skoordynowany z tlenem pochodzącym z grupy karboksylowej kwasu asparaginowego D100 i tlenem z grupy karboksylowej kwasu glutaminowego E163, tlenem z cząsteczki wody oraz azotem z pierścienia imidazolowego H67 (Rysunek 5A).

21. UCSF Chimera package (<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera>).



Rysunek 5A. Centrum aktywne [Zn\_(DapE)] z *Haemophilus influenzae* (PDB 3ISZ)

W formie dicynkowej ([ZnZn(DapE)]) (Rysunek 5B), odległość pomiędzy dwoma atomami centralnymi cynku(II) w miejscu aktywnym wynosi 3,36 Å. Obydwa atomy centralne cynku(II) posiadają zniekształconą tetraedryczną strukturę koordynacyjną. Drugi cynk(II) jest skoordynowany z azotem grupy imidazolowej z H349 oraz tlenem z grupy karboksylowej pochodzącej z E135. Atomy centralne cynku Zn1(II) i Zn2(II) połączone z jednej strony atomem tlenu z grupy karboksylowej z D100, a z drugiej atomem tlenu z cząsteczki wody, tworzą rdzeń (μ-akwa)(μ-karboksylano)dicynk(II).

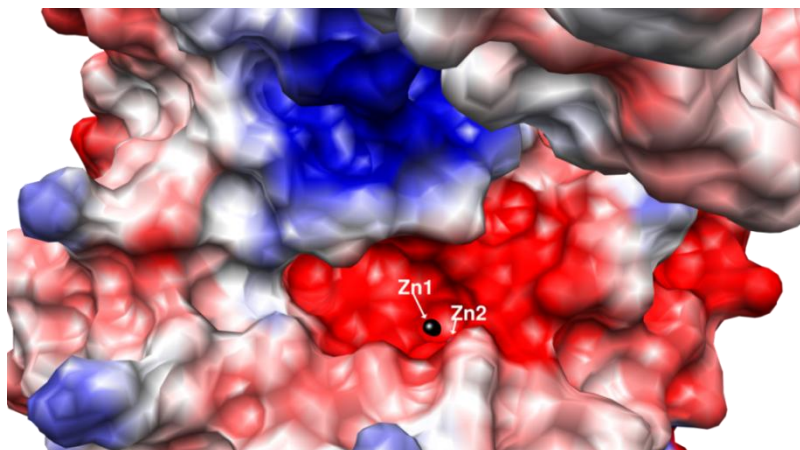


Rysunek 5B. Centrum aktywne [ZnZn(DapE)] z *Haemophilus influenzae* (PDB 3IC1)

Otrzymane struktury [Zn\_(DapE)] i [ZnZn(DapE)] potwierdziły nasze wcześniejsze wyniki badań dotyczących roli H67 i H349 oraz E134 [17, 18]. Obydwie histydyny są ligandami atomów centralnych cynku(II), przy czym H67 jest ligandem cynku(II)



w pierwszym miejscu wiązania, a położenie glutaminianu E134 wskazuje na jego ważną rolę w procesie katalizy. Lokalizacja i budowa centrum aktywnego DapE bardzo przypomina centra aktywne AAP i CPG2 [22, 23], w których odległość atomów centralnych Zn(II) wynosi odpowiednio 3,45 Å i 3,25 Å. Analiza powierzchni molekularnej DapE, połączona z analizą rozkładu ładunków na powierzchni enzymu wykazała, że wzdłuż domeny katalitycznej występuje charakterystyczna szczelina, w której skumulowany jest ładunek ujemny (Rysunek 6).



Rysunek 6. Powierzchnia molekularna [ZnZn(DapE)] z *H. influenzae* (widoczna szczelina wzdłuż domeny katalitycznej).

*Kolory: czerwony - ładunek ujemny; niebieski – ładunek dodatni*

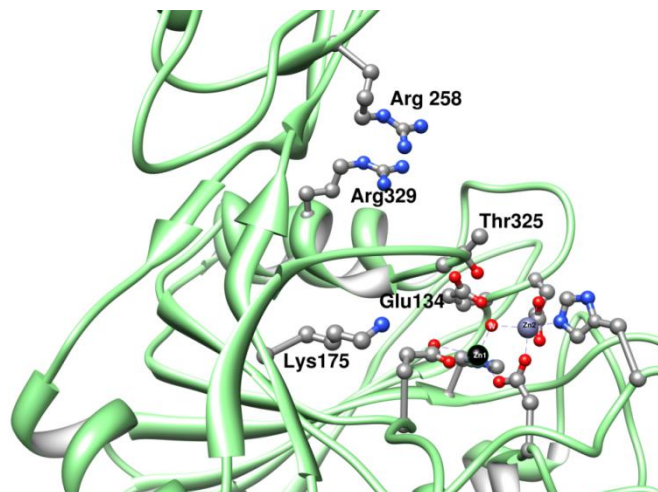
Substrat - kwas *N*-bursztyniło-L,L-2,6-diaminopimelinowy - zostaje umieszczony w szczelinie, przy czym wiązanie peptydowe zwrócone jest w kierunku dwurdzeniowego metalicznego centrum. Takie ułożenie substratu jest stabilizowane poprzez oddziaływanie grup karboksylowych substratu z dodatnio naładowanymi łańcuchami bocznymi aminokwasów otaczających centrum aktywne.

Analiza struktury DapE pozwoliła także na wytypowanie aminokwasów, które mogą uczestniczyć w procesie katalitycznym (Rysunek 7).

---

22. Desmarais W., Bienvenue D.L., Bzymek K.P., Petsko G.A., Ringe D., Holz R.C. The high-resolution structures of the neutral and the low pH crystals of aminopeptidase from *Aeromonas proteolytica*. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2006**, 11, 398-408.

23. Rowsell S., Pauptit R.A., Tucker A.D., Melton R.G., Blow D.M., Brick P. Crystal structure of carboxypeptidase G<sub>2</sub>, a bacterial enzyme with applications in cancer therapy. *Structure* **1997**, 5, 337-347.

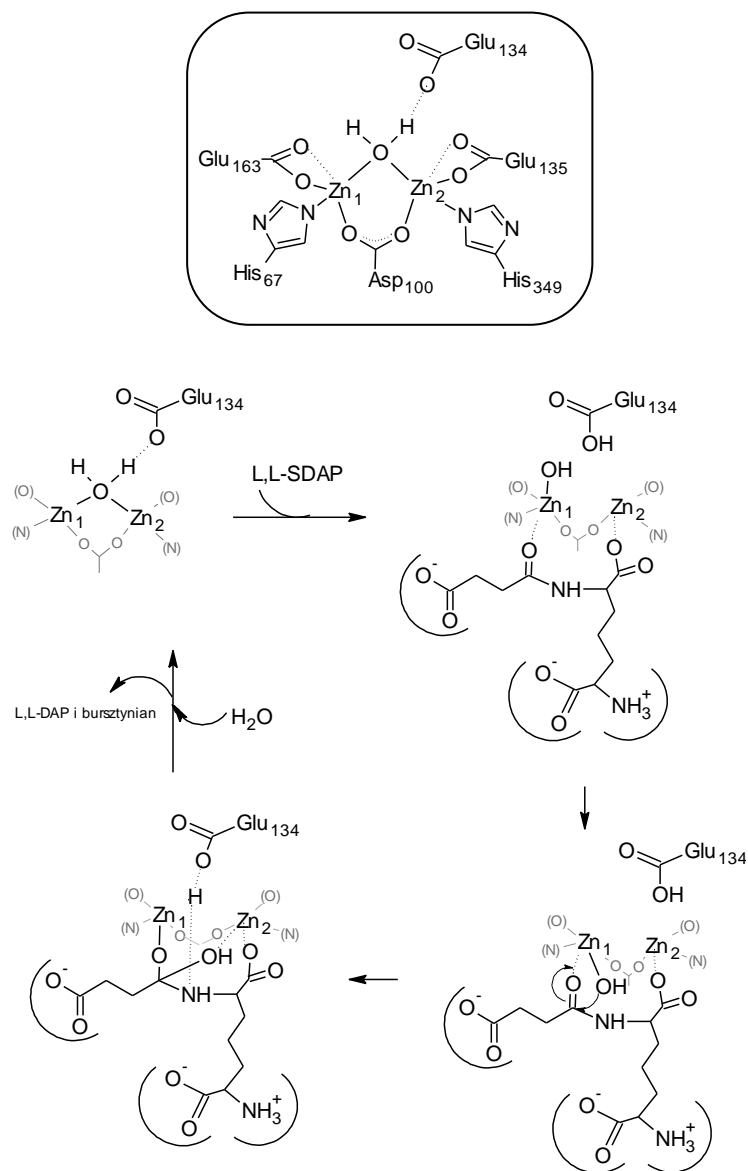


Rysunek 7. Centrum aktywne DapE – aminokwasy mogące oddziaływać z substratem w procesie katalitycznym.

Należą do nich m.in. Lys175 z jednej strony oraz Arg258 i Arg329 z drugiej. Łańcuch boczny Lys175 znajduje się w odległości  $\sim 6 \text{ \AA}$  od centrum aktywnego, co umożliwia oddziaływanie grupy aminowej lizyny z grupą karboksylową reszty bursztynianowej substratu, a tym samym uczestniczenie w rozpoznawaniu i wiązaniu substratu w miejscu aktywnym. Arg329 z kolei tworzy razem z Arg258 dodatnio naładowaną kieszeń mogącą oddziaływać z grupą karboksylową łańcucha bocznego kwasu diaminopimelinowego w substracie. Wcześniej, podobne oddziaływanie zaproponowano dla argininy324 i lizyny177 występującej w centrum aktywnym karboksypeptydazy CPG<sub>2</sub> [23]. Ciekawe jest także ułożenie Thr325 na pętli “przykrywającej” centrum aktywne DapE. Prawdopodobnie odgrywa ona również istotną rolę w umiejscowieniu substratu w szczelinie centrum aktywnego oraz stabilizacji stanu przejściowego. Obecnie trwają badania odpowiednio zmutowanych enzymów, w których powyższe aminokwasy zostały zastąpione aminokwasami nie posiadającymi naładowanych łańcuchów bocznych.

#### Proponowany mechanizm katalityczny

Na podstawie struktury krystalicznej DapE i mechanizmów działania podobnych metalohydrolaz (np. AAP [6]) zaproponowaliśmy mechanizm katalityczny (Rysunek 8).



Rysunek 8. Proponowany mechanizm hydrolizy L,L-SDAP wobec [ZnZn(DapE)].

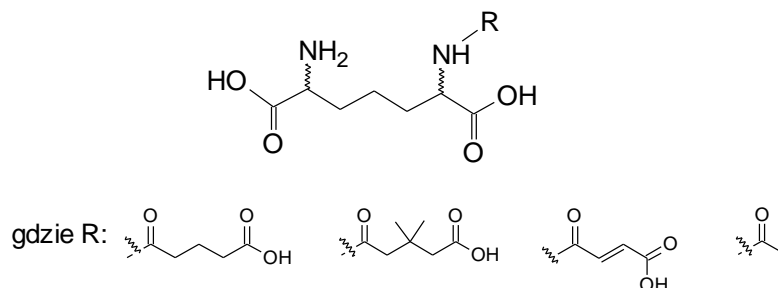
Po rozpoznaniu i umieszczeniu substratu (L,L-SDAP) w szczelinie domeny katalitycznej, tlen z grupy aminokarbonylowej zostaje skoordynowany z Zn1, w wyniku czego następuje podwyższenie liczby koordynacyjnej cynku z 4 do 5 i aktywacja grupy karbonylowej. Jednocześnie Glu134 odrywa proton od cząsteczki wody łączącej jony cynku, z utworzeniem nukleofilowej reszty hydroksylowej. W kolejnym etapie związana z Zn1 grupa hydroksylowa atakuje atom węgla aktywowanej grupy karbonylowej, tworząc przejściowy  $\eta$ -1- $\mu$ -kompleks [24]. Glu134 przekazuje następnie proton do grupy aminowej substratu, czemu towarzyszy rozerwanie wiązania peptydowego. Po uwolnieniu produktów hydrolizy,

24. Cospers N.J., Bienvenue D.L., Shokes J.E., Gilner D.M., Tsukamoto T., Scott R.A., Holz R.C. The *dapE*-encoded *N*-Succinyl-L,L-Diaminopimelic Acid Desuccinylase from *Haemophilus influenzae* Is a Dinuclear Metallohydrolase. *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125(48), 14654-14655 (**Publikacja Nr IX**).

następuje połączenie atomów centralnych cynku(II) mostkiem wodnym. W przypadku obecności tylko jednego metalu w centrum aktywnym, His349 spełnia rolę czynnika orientującego i umieszczającego substrat w centrum aktywnym, poprzez tworzenie wiązania wodorowego z grupą karboksylową substratu, co stabilizuje stan przejściowy.

Potencjalne inhibitory *dapE*-kodowanej hydrolazy bursztynianowej kwasu *N*-bursztynyl-2,6-*L,L*-diaminopimelinowego z *Haemophilus influenzae*

W badaniach specyficzności substratowej DapE wykazałam, że enzym ten jest nie tylko wysoce substrato-, ale także stereospecyficzny. Na podstawie uzyskanych wyników oraz budowy centrum aktywnego DapE, jeszcze przed rozwiązaniem struktury krystalicznej, zaproponowałam grupę potencjalnych inhibitorów tego enzymu. We wstępnych badaniach szeregu mono-*N*-acylowanych pochodnych kwasu diaminopimelinowego o różnej długości i budowie łańcucha bocznego (Rysunek 9), dostarczonych przez grupę badawczą z Instytutu Chemii Organicznej i Biochemii, Czeskiej Akademii Nauk wykazałam, że żaden z tych związków nie jest inhibitorem DapE. Dostarczone związki były jednak mieszaninami racemicznymi.



Rysunek 9. *N*-acylowe pochodne kwasu 2,6-diaminopimelinowego jako potencjalne inhibitory DapE.

W celu identyfikacji innych struktur wiodących, wytypowałam ponad 30 prostych, handlowo dostępnych związków, z grupami funkcyjnymi posiadającymi powinowactwo do cynku (tzw. zinc-binding groups; ZBG). Większość badanych związków, oprócz ZBG zawierała również grupę karboksylową, która mogła oddziaływać z dodatnio naładowanymi aminokwasami znajdującymi się w pobliżu centrum aktywnego - lizyną bądź arginina. Przetestowałam m.in. związki zawierające grupy tiolowe, karboksylowe, hydroksamowe, boronowe, fosfonowe. Dzięki wstępnej selekcji wskazałam kilka potencjalnych

mikromolowych inhibitorów (Tabela 1) [25]. Większość z nich zawierała zarówno grupę tiolową jak i karboksylową w cząsteczce.

Tabela 1. Potencjalne inhibitory DapE

Lp.	Struktura badanego związku	IC <sub>50</sub> (μM)
1.		43,0
2.		34,0
3.		13,7 K <sub>i</sub> 4,6±0,6μM
4.		50,0
5.		3,3 K <sub>i</sub> 1,82±0,09μM
6.		42,0
7.		107,0 K <sub>i</sub> 56,9±3,6μM
8.		92,0 K <sub>i</sub> 67,0±3,8μM (niekompetycyjny)

Najlepsze wyniki inhibicji (K<sub>i</sub> 1,82 μM) uzyskałam dla znanego i powszechnie stosowanego m.in. na nadciśnienie, leku - L-kaptoprilu (Tabela 1, Lp.5), inhibitora konwertazy angiotensyny, ACE. Inny inhibitor ACE – enalapril nie wykazywał natomiast właściwości inhibicyjnych. Przedstawione w tabeli dane wskazują również, że dużo lepszymi inhibitorami są izomery L- związków (izomery D zarówno penicyloaminy Lp. 4 jak i kaptoprilu Lp. 6, wykazują znacznie wyższe wartości IC<sub>50</sub>). Widać również, że nawet proste związki jak np. kwas 4-merkaptobutanowy (Lp. 1) wykazują właściwości inhibicyjne DapE. Mogą więc one służyć jako syntony do zaprojektowania, a następnie syntezy bardziej złożonych struktur inhibitorów DapE.

Ustaliłam również, że L-kaptopril wykazuje bardzo słabe właściwości antybakteryjne w stosunku do szczepu bakterii *E.coli* (metoda dyfuzyjno-krażkowa). Inhibicja wzrostu bakterii

25. Gillner D., Armoush N., Holz R.C., Becker D.P. Inhibitors of bacterial *N*-succinyl-L,L-diaminopimelic acid desuccinylase (DapE) and demonstration of in vitro antimicrobial activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, 19, 6350-6352 (Publikacja Nr VI).

na płytce była wyraźnie widoczna dopiero przy ilości 5-20 mg. Późniejsze badania *in vivo* [26] wykazały jednak, że DapE prawdopodobnie nie jest głównym celem molekularnym L-kaptoprilu, gdyż związek ten wykazywał słabe właściwości inhibicyjne wzrostu *Salmonella enterica* i *E. coli* niezależnie od obecności DapE.

We wstępnych badaniach mechanizmu wiązania się inhibitorów do centrum aktywnego DapE zastosowaliśmy spektroskopię absorpcyjną promieniowania rentgenowskiego (EXAFS) dla [ZnZn(DapE)], w obecności znanych kompetycyjnych inhibitorów metalohydrolaz: kwasu 3-fosfonopropanowego (CEPA;  $K_i = 800 \mu\text{M}$ ) i kwasu 5-merkaptopentanowego (MSPA;  $K_i = 6 \mu\text{M}$ ) [24]. Wykazaliśmy, że w przypadku pochodnej fosfonowej następuje utworzenie mostka  $\eta$ -1- $\mu$ -fosfonowego w miejsce cząsteczki wody, łączącej jony cynku w natywnym enzymie (podobnie jak to udowodniono dla aminopeptydazy leucynowej z *Aeromonas proteolytica* [27, 28]. Dane uzyskane dla [ZnZn(DapE)] - MSPA wskazują natomiast na wiązanie grupy tiolowej do jednego lub obu atomów centralnych cynku(II). Według danych uzyskanych w ostatnim czasie (struktura DapE z inhibitorem zawierającym grupę tiolową – dane nieopublikowane), siarka z grupy tiolowej tworzy mostek łączący atomy centralne cynku(II).

### **Aminopeptydaza leucynowa z *Vibrio proteolyticus* (*Aeromonas proteolytica*) (AAP)**

Aminopeptydazy leucynowe (LAP), katalizują odszczepienie *N*-końcowych aminokwasów od substratów białkowych lub peptydowych. Ich główna funkcja polega na modyfikacji, aktywacji, jak również degradacji protein. Ważną rolą aminopeptydaz jest także ich udział w procesach obronnych, starzenia się organizmów oraz w procesie gojenia ran, o czym świadczy ich zwiększona aktywność w takich sytuacjach. Dotyczy to zarówno ssaków, jak i pasożytów oraz roślin [29, 30, 31]. Nieprawidłowe funkcjonowanie LAP powiązane jest ze stanami chorobowymi takimi jak nowotwory, infekcja wirusem HIV, katarakta czy

---

26. Uda N.R., Creus M. Selectivity of inhibition of *N*-succinyl-L,L-diaminopimelic acid desuccinylase in Bacteria: The product of *dapE*-gene is not the target of L-captopril antimicrobial activity. *Bioinorganic Chemistry and Applications* **2011**, 306465, 6pp DOI 10.1155/2011/306465

27. Stamper C.C., Bennett B., Edwards T., Holz R.C., Ringe D., Petsko G.A. Inhibition of the aminopeptidase from *Aeromonas proteolytica* by L-leucinephosphonic acid. Spectroscopic and crystallographic characterization of the transition state of peptide hydrolysis. *Biochemistry* **2001**, 40, 7035-7046.

28. Sträter N., Lipscomb W.N. Transition state analogue L-leucinephosphonic acid bound to bovine lens leucine aminopeptidase: X-ray structure at 1.65 Å resolution in a new crystal form. *Biochemistry* **1995**, 34, 9200-9210.

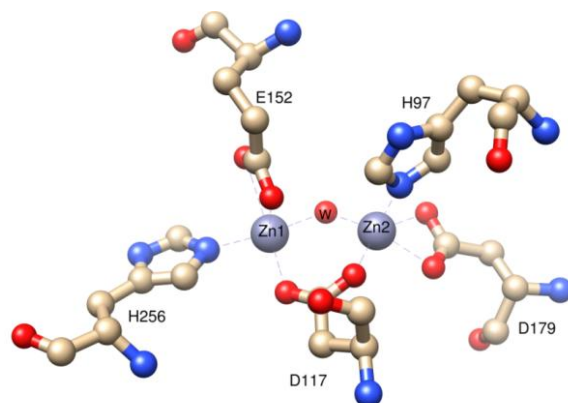
29. Mizutani S., Wright J., Kobayashi H. A new approach regarding the treatment of preeclampsia and preterm labor. *Life Sciences*, **2011**, 88, 17-23.

30. Prager M.D., Sabeh F., Baxter C.R., Atilas L., Hartline B. Dipeptidyl peptidase IV and aminopeptidase in burn wound exudates: implications for wound healing. *J. Trauma*, **1994**, 36, 629-633.

31. Vasquez J.N., Tu Ch.-J., Park S.-Y., Walling L.L. Targeting and localization of wound-inducible leucine aminopeptidase A in tomato leaves. *Planta*, **2008**, 227, 341-351

malaria [32, 33]. Obecnie enzymy te są celami molekularnymi dla stosowanych leków przeciwnowotworowych (fumagillin, ovalicin). Inhibicja aminopeptydazy leucynowej przez naturalny peptydomimetyk - bestatynę powoduje znaczne zahamowanie rozwoju wirusa HIV. W ostatnich latach prowadzone są intensywne badania nad opracowaniem nowych leków antymalarycznych hamujących aktywność aminopeptydazy leucynowej patogena *Plasmodium falciparum* [34, 35].

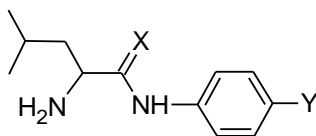
Jednym z najlepiej scharakteryzowanych enzymów z grupy aminopeptydaz leucynowych jest aminopeptydaza leucynowa z *Aeromonas (Vibrio) Proteolytica* (EC 3.4.11.10; AAP) [6]. Jest to monomeryczny enzym o masie 29,5 kDa, posiadający typowe dicynkowe centrum aktywne (Rysunek 10), w którym poszczególne atomy metalu wiążą się sekwencyjnie i można je zastąpić innymi metalami przejściowymi. Charakteryzuje się także wyjątkową termostabilnością (stabilna w temperaturze 70°C nawet przez kilka godzin). Te cechy oraz możliwość manipulacji genetycznej sprawiają, że jest ona idealnym modelem do badań zależności pomiędzy strukturą a funkcją enzymu oraz badań mechanistycznych. Dodatkowym atutem jest opisana niedawno metoda łatwego otrzymania czystego enzymu w stosunkowo dużych ilościach (>10mg/L) [36].



Rysunek 10. Centrum aktywne [ZnZn(AAP)] z *Vibrio proteolyticus* (PDB 1RTQ).

- 
32. Lowther W.T., Matthews B.W. Metalloaminopeptidases: Common Functional Themes in Disparate Structural Surroundings. *Chem. Rev.* **2002**, 102, 4581-4607.
33. Stack C.M., Lowther J., Cunningham E., Donnelly S., Gardiner D.L., Trenholme K.R., Skinner-Adams T.S., Teuscher F., Grembecka J., Mucha A., Kafarski P., Lua L., Bell A., Dalton J.P. Characterization of the *Plasmodium falciparum* M17 leucyl aminopeptidase. A protease involved in amino acid regulation with potential for antimalarial drug development. *J. Biol. Chem.* **2007**, 282, 2069.
34. Skinner-Adams T.S., Stack C.M., Trenholme K.R., Brown C.L., Grembecka J., Lowther J., Mucha A., Drag M., Kafarski P., McGowan S., Whisstock J.C., Gardiner D.L., Dalton J.P. *Plasmodium falciparum* neutral aminopeptidases: new targets for anti-malarials. *Trends Biochem. Sci.* **2010**, 35, 53.
35. Mucha A., Drag M., Dalton J. P., Kafarski P. Metallo-aminopeptidase inhibitors. *Biochimie* **2010**, 92, 1509.
36. Hartley M., Bennett B. Heterologous expression and purification of *Vibrio proteolyticus* (*Aeromonas proteolytica*) aminopeptidase: A rapid protocol. *Protein Express. Purif.* **2009**, 66, 91-101.

W celu bliższego poznania mechanizmu etapu wiązania substratu do centrum aktywnego AAP, przeprowadziłam badania szeregu analogów substratu, w których tlen w grupie karbonylowej wiązania amidowego zastąpiłam siarką. W ramach pracy otrzymałam i zastosowałam szereg pochodnych L-leucyny z grupą amidową lub tioamidową (Rysunek 11) [37].



Gdzie:

- 1 X=O; Y=H
- 2 X=O; Y=OCH<sub>3</sub>
- 3 X=S; Y=H
- 4 X=S; Y=OCH<sub>3</sub>

Rysunek 11. Analogi substratów AAP.

Badania AAP przeprowadziłam stosując formę natywną [ZnZn(AAP)], jak również [CdCd(AAP)] oraz heterodimetaliczne - [ZnCd(AAP)] i [CdZn(AAP)]. Związki **1-4** były hydrolizowane przez dicynkową formę AAP oraz [ZnCd(AAP)] i [CdZn(AAP)]. W przypadku [CdCd(AAP)] nie zaobserwowałam aktywności hydrolitycznej wobec badanych analogów **1-2** z grupą karbonylową, co może być wynikiem niedostatecznej polaryzacji wiązania karbonylowego, umożliwiającego nukleofilowy atak jonu hydroksylowego.

Porównanie wartości  $K_m$  dla [CdCd(AAP)] oraz [ZnZn(AAP)] w przypadku substratów tioamidowych **3-4** wskazuje, że zastąpienie natywnego cynku(II) kadmem(II), powoduje nieznacznie silniejsze wiązanie tych związków (przykładowo dla pochodnej **3**  $K_m = 8,0\mu\text{M}$  dla Cd(II) i  $10\ \mu\text{M}$  dla Zn(II)). Otrzymane w ramach badań wyniki pozwoliły na zaproponowanie mechanizmu, w którym tlen z grupy aminokarbonylowej substratu oddziałuje bezpośrednio z metalami w centrum aktywnym AAP.

Opisane w literaturze badania oddziaływania omawianych związków z innymi peptydazami wykazały, że zdolność hydrolizy tioamidowych analogów substratu posiadała karboksypeptydaza A [38], w której cynk(II) w centrum aktywnym zastąpiono kadmem(II).

37. Bienvenue D.L., Gilner D., Holz R.C. Hydrolysis of Thiono-peptides by the Aminopeptidase from *Aeromonas proteolytica*: Insight into Substrate Binding. *Biochemistry* **2002**, 41(11), 3712-3719. (Publikacja Nr X)

38. Mock W. L., Chen J. T., Tsang J. W. Hydrolysis of a thiopeptide by cadmium carboxypeptidase A. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1981**, 102, 389-396.



Dla aminopeptydazy leucynowej z nerki wieprzowej natomiast związek **3** był inhibitorem, a wartość  $K_i$  wynosiła  $190\mu\text{M}$  [39].

Wcześniejsze badania wykazały, że w procesie hydrolizy wobec AAP, w pierwszym etapie *N*-terminalna grupa aminowa oddziałuje z kieszenią hydrofobową znajdującą się w pobliżu centrum aktywnego enzymu [40]. Na podstawie danych kinetycznych i spektroskopowych uzyskanych w niniejszej pracy zaproponowaliśmy, że kolejnym etapem jest koordynacja tlenu grupy karbonylowej do Zn1, co jest kluczowe dla aktywacji węgla grupy karbonylowej i ataku nukleofila. Trzecim etapem jest oddziaływanie *N*-terminalnej grupy aminowej z Zn2. Po nukleofilowym ataku grupy hydroksylowej związanej z atomem centralnym Zn(II) na węgiel grupy karbonylowej, tworzy się tetraedryczny kompleks przejściowy, stabilizowany poprzez oddziaływanie z obydwojoma atomami centralnymi Zn(II).

W pracy przeglądowej [6] wykazaliśmy, że mimo iż w ostatnich latach, m.in. dzięki danym obliczeniowym, kinetycznym, termodynamicznym, spektroskopowym oraz krystalograficznym, znacznemu poszerzeniu uległa wiedza na temat mechanizmu reakcji hydrolizy katalizowanej AAP, w środowisku naukowym nie ma jednoznacznych poglądów co do mechanizmu wiązania się grupy karbonylowej substratu do cynku(II) (wiązanie do Zn1, czy też tworzenie mostka pomiędzy dwoma atomami centralnymi cynku(II), lub wynikająca jedynie z obliczeń DFT wersja, w której *N*-terminalna grupa aminowa, a nie grupa karbonylowa, wiąże się z centrum aktywnym poprzez Zn2). W kolejnym etapie proponowane są (w oparciu o opisane dowody eksperymentalne) dwa możliwe rozwiązania. Dla pierwszej wersji byłoby to zerwanie wiązania Zn2-(OH)H z jednoczesnym wiązaniem *N*-terminalnej grupy aminowej do Zn2. W tym przypadku grupa hydroksylowa związana z Zn1 atakuje aktywowany atom węgla grupy karbonylowej, z utworzeniem *gem*-diolowego produktu pośredniego stabilizowanego przez koordynację obu atomów tlenu do dicynkowego centrum. Alternatywny mechanizm sugeruje, że grupa hydroksylowa jest połączona z Zn2 i spełnia rolę nukleofila, atakującego aktywowany karbonylowy atom węgla substratu. Kolejnym etapem jest tworzenie się tetradrycznego stanu przejściowego. W tym przypadku rolą Zn1 byłoby tylko stabilizowanie grupy hydroksylowej łączącej jony metali i aktywowanie grupy karbonylowej *N*-terminalnego aminokwasu.

---

39. Beattie R.E., Elmore D.T., Williams C.H., Guthrie D.J.S. The behavior of leucine aminopeptidase towards thiono-peptides. *Biochem. J.* 1987, 245, 285-288.

40. Chen G., Edwards T., D'souza V.M., Holz R.C. Mechanistic Studies on the Aminopeptidase from *Aeromonas proteolytica*: A Two-Metal Ion Mechanism for Peptide Hydrolysis. *Biochemistry* **1997**, 36, 4278-4286.

### ArgE-kodowana deacetylaza N-acetylo-L-ornityny z *Escherichia coli* (ArgE)

Kolejnym źródłem potencjalnych nowych celów molekularnych jest szlak biosyntezy argininy. Prokarioty syntetyzują argininę w serii ośmiu reakcji, wyróżniających je od eukariotów dwoma etapami: acetylowanie glutaminianu i deacetylowanie prekursora argininy –  $N^{\alpha}$ -acetylo-L-ornityny (L-NAO), z udziałem *argE*-kodowanej deacetylazy *N*-acetylo-L-ornityny (ArgE) [41, 42]. ArgE występuje tylko u prokariotów i jest niezbędna zarówno do syntezy argininy jak i do prawidłowego funkcjonowania ściany komórkowej bakterii, stanowi więc dobry cel molekularny do zaprojektowania nowej klasy związków o działaniu przeciwdrobnoustrojowym. ArgE z *E.coli*, podobnie jak poprzednio omawiane metalohydrolazy, jest enzymem dwurdzeniowym, wymagającym dwóch atomów centralnych cynku(II) do osiągnięcia maksimum aktywności, o masie cząsteczkowej ~42 kDa.

W badaniach inhibicyjnych szeregu  $N^{\alpha}$ -acylowych i alkilowych oraz  $N^{\alpha}$ -alkoksykarbonylowych pochodnych L- i D-ornityny (Tabela 2), będących analogami substratu -  $N^{\alpha}$ -acetylo-L-ornityny (L-NAO) [43], zastosowałam związki otrzymane w grupie badawczej Instytutu Chemii Organicznej i Biochemii, Czeskiej Akademii Nauk.

Dla większości badanych pochodnych otrzymałam wartości  $IC_{50}$  w zakresie mikromolarnym. Dla pochodnej  $N^{\alpha}$ -acetylo-D-ornityny wartość  $IC_{50}$  wynosiła 410  $\mu$ M. Najlepszym inhibitorem okazała się  $N^{\alpha}$ -chloroacetylo-L-ornityna ( $IC_{50}$  85  $\mu$ M).  $N^{\alpha}$ -dichloroacetylo-L-ornityna,  $N^{\alpha}$ -trichloroacetylo-L-ornityna i  $N^{\alpha}$ -trifluoroacetylo-L-ornityna były słabszymi inhibitorami ( $IC_{50}$  odpowiednio 340, 450 i 200  $\mu$ M). Spośród badanych pochodnych acetylowych, lepsze właściwości inhibicyjne posiadały te z małymi grupami R ( $CH_2Cl >> CF_3 > CHCl_2 > CCl_3$ ). W przypadku pochodnych  $N^{\alpha}$ -trichloroacetyloornityny, pochodne D-ornityny wykazywały nieznacznie lepsze właściwości inhibicyjne.

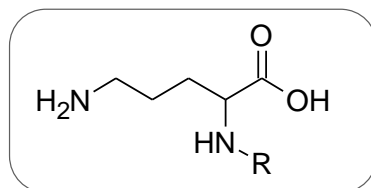
---

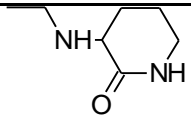
41. Cunin R., Glansdorff N., Pierard A., Stalon V. Biosynthesis and metabolism of arginine in bacteria. *Microbiol Rev.* **1986**, 50, 314-352.

42. Ledwidge R., Blanchard J.S. The dual biosynthetic capability of N-acetylornithine aminotransferase in arginine and lysine biosynthesis. *Biochemistry* **1999**, 38, 3019-3024.

43. Hlaváček J., Picha J., Vaněk V., Jiráček J., Slaninová J., Fučík V., Buděšinský M., Gilner D., Holz R.C. Inhibitors of  $N^{\alpha}$ -acetyl-L-ornithine deacetylase: synthesis, characterization and analysis of their inhibitory potency. *Amino Acids*, **2010**, 38, 1155-1164. (Publikacja Nr IV).

Tabela 2. Analogi  $N^{\alpha}$ -acetylo-L-ornityny jako potencjalne inhibitory ArgE



Lp.	R	IC <sub>50</sub> (mM)
1.*	CH <sub>3</sub> CO-	0,41
2.	(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> C-CO-	~5,40
3.	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CH-CO-	1,21
4.	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CO-	0,42
5.	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> -CO-	0,76
6.	CF <sub>3</sub> CO-	0,20
7.	<b>CH<sub>2</sub>ClCO-</b>	<b>0,085</b>
8.	CHCl <sub>2</sub> CO-	0,34
9.	CCl <sub>3</sub> CO-	0,45
10.*	CCl <sub>3</sub> CO-	0,32
11.	CH <sub>3</sub> -O-CO-	1,01
12.	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> -O-CO-	0,25
13.	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> )-O-CO-	1,16
14.	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CH-O-CO-	1,40
15.	CH <sub>3</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -O-CO-	0,71
16.	(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> C-O-CO-	0,54
17.		2,50

\*- pochodna D-ornityny

Przeprowadzone w Instytucie Chemii Organicznej i Biochemii, Czeskiej Akademii Nauk doświadczenia na szczepach bakterii *Bacillus subtilis*-168 wykazały słabe, bądź bardzo słabe właściwości inhibicyjne badanych związków. Nie zaobserwowano natomiast żadnej aktywności w stosunku do *E. coli* w badanych warunkach.

### ***Ewentualne wykorzystanie wyników***

W ostatnich latach wiele uwagi poświęca się problemowi wzrastającej oporności drobnoustrojów na istniejące leki. Pociąga to za sobą konieczność opracowania nowych leków, ale także znalezienia nowych celów molekularnych.

Badane w ramach niniejszej pracy enzymy - *dapE*-kodowana hydrolaza bursztynianowa kwasu *N*-bursztyniło-L,L-2,6-diaminopimelinowego z *Haemophilus influenzae* (DapE) oraz *argE*-kodowana deacetylaza *N*-acetylo-L-ornityny (ArgE), uczestniczą w szlakach biosyntezy ważnych aminokwasów *mezo*-diaminopimelinianu i lizyny (DapE) oraz argininy (ArgE) w organizmach drobnoustrojów. Ze względu na fakt, że omawiane ścieżki biosyntezy nie występują u ssaków, enzymy te stanowią dobry cel molekularny dla nowych leków przeciwdrobnoustrojowych. Efektywne i selektywne inhibitory jednego lub kilku enzymów uczestniczących w tych szlakach mogą wykazywać selektywną toksyczność w stosunku do drobnoustrojów, przy niewielkim wpływie na organizmy ssaków (szczególnie człowieka).

Ważnym aspektem opracowania nowych leków jest wnikliwe poznanie celu molekularnego. Charakterystyka DapE, przeprowadzona w ramach niniejszej pracy, dostarcza konkretnych danych takich jak: specyficzność substratowa, aktywność z szerokim spektrum metali, struktura krystaliczna, mechanizm katalityczny, rola poszczególnych aminokwasów w centrum aktywnym, co daje nadzieję na znaczne przyspieszenie prac związanych z zaprojektowaniem efektywnych związków hamujących aktywność tego enzymu. Dodatkowo, rozwiązanie struktury krystalograficznej DapE z jednym atomem centralnym Zn(II), pozwala na poznanie mechanizmu katalitycznego w sytuacji niedoboru jonów metali oraz wykorzystanie tych informacji w badaniu innych dwurdzeniowych metalohydrolaz cynkowych. Z kolei wytypowane proste związki hamujące aktywność DapE i ArgE w stężeniach mikromolowych stanowią podstawę do zaprojektowania bardziej efektywnych inhibitorów, a w przyszłości potencjalnych leków.

Dane uzyskane w badaniach aminopeptydazy leucynowej z *Vibrio proteolyticus*, pozwoliły z kolei na znacznie dokładniejsze poznanie mechanizmu działania enzymu, który jest modelem wielu ważnych dwurdzeniowych metaloenzymów.

### **5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych**

Działalność naukową w Instytucie Chemii i Technologii Organicznej Politechniki Śląskiej rozpoczęłam jeszcze na studiach. Wynikiem tych badań była opatentowana metoda

otrzymywania 2-nitro-5-fenyltioaniliny [44] oraz metoda wydzielenia 5-chloro-2-nitroacetanilidu z mieszaniny izomerycznych chloronitroacetanilidów [45, 46]. Związki te są półproduktami w syntezie leków przeciwbaczących z grupy pochodnych benzimidazoli lub fenyloguanidyn, stosowanych w leczeniu ludzi i zwierząt. Wyniki uzyskane w ramach mojej pracy magisterskiej zostały z kolei wykorzystane podczas wdrożenia technologii otrzymywania nadtlenu dikumylowego, w Perfor Industrial S.A. (Sao Paulo, Salvador, Brazylia).

Po studiach rozpoczęłam pracę w zespole prof. Jana Zawadiaka, gdzie przez wiele lat zajmowałam się katalitycznym utlenianiem węglowodorów alkiloaromatycznych odpowiednimi wodoronadtlenkami oraz tlenem [47, 48]. Najczęściej stosowanymi katalizatorami były układy złożone z soli metali o zmiennej wartościowości oraz czwartorzędowych soli alkiloamoniowych, eterów koronowych i środków powierzchniowo-czynnych. W publikacjach wykazaliśmy, że najbardziej aktywne są katalizatory złożone z  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  i czwartorzędowych soli alkiloamoniowych, oraz wyjaśniliśmy częściowo mechanizm działania stosowanych układów katalitycznych [49, 50, 51, 52]. W badaniach utleniania kumenu po raz pierwszy wykazałam, że wobec układu  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ /czwartorzędowe sole alkiloamoniowe, możliwe jest otrzymanie nadtlenu, w

- 
44. Skibiński A., Świerczek K., Stec Z., **Gilner D.**, Januchowski M., Michałowski P., Parys L., Radziwonka T., "Verfahren zur Herstellung von 2-Nitro-5-phenylthioanilin". German Patent Appl. DE 4 202 262 A1 (30.07.1992).
  45. Skibiński A., **Gilner D.**, Stec Z., Świerczek K., Januchowski M., Michałowski P., Parys L., Radziwonka T., „Sposób wydzielenia 5-chloro-2-nitroacetanilidu z mieszaniny izomerycznych chloronitroacetanilidów zawierających 5-chloro-2-nitroacetanilid i 3-chloro-4-nitroacetanilid”, Patent Polski **PL 165008** (31.10.1994).
  46. Skibiński A., **Gilner D.**, Stec Z., Świerczek K., Januchowski M., Michałowski P., Parys L., Radziwonka T., "Verfahren zur Abscheidung von 5-Chlor-2-nitroacetanilid aus der Mischung von isomeren Chlornitroacetaniliden enthaltend 5-Chlor-2-nitroacetanilid und 3-Chlor-4-nitroacetanilid" German Patent Appl. **DE 4 202 263 A1** (30.07.1992).
  47. Zawadiak J., Stec Z., Kulicki Z., Burghardt A., **Gilner D.**, Two-steps Technology of Dicumyl Peroxide Synthesis from Cumene Hydroperoxide and Cumene, *Przem. Chem.* **1995**, 74(1), 11-12.
  48. Zawadiak J., **Gilner D.**, Synthesis of *t*-Butyl- $\alpha$ -cumyl Peroxide from *t*-Butyl Hydroperoxide and Cumene in the Presence of Cupric Chloride/Tetrabutylammonium Bromide Catalytic System, *Pol. J. Appl. Chem.* **1995**, 39(2), 225-232.
  49. Zawadiak J., **Gilner D.**, Mazurkiewicz R., Copper Salt-Crown Ether Systems as Catalysts for the Oxidation of Cumene with 1-Methyl-1-phenylethylhydroperoxide to bis(1-Methyl-1-phenylethyl) peroxide, *Tetrahedron Lett.* **1999**, 40, 4059-4062.
  50. Zawadiak J., **Gilner D.**, Mazurkiewicz R., Orlińska B., Copper Salt-Crown Ether System as Catalysts for the Oxidation of Isopropyl Arenes with Tertiary Hydroperoxides to Peroxides, *Appl. Catal. A: General*, **2001**, 205, 239-243.
  51. Orlińska B., Zawadiak J., **Gilner D.**, Copper(II) chloride/tetrabutylammonium bromide as a catalytic system for the oxidation of 2-isopropyl-naphthalene with oxygen, *Appl. Catal. A: General*, **2005**, 287, 68-74.
  52. **Gilner D.**, Zawadiak J., Mazurkiewicz R., Kurczewska J., Schroeder G., Orlińska B., ESI-MS study on the copper chloride/PTC catalytic systems for the oxidation of cumene with 1-methyl-1-phenylethyl hydroperoxide, *Monatsh. Chem.* **2010**, 141, 143-147.

jednoetapowym procesie utleniania tlenem [53]. Badania te, rozszerzone o wiele innych węglowodorów, były później kontynuowane jako jeden z wielu tematów realizowanych we współpracy z niemieckimi firmami Rütgers Kureha Solvents GmbH i Rütgers Chemicals AG. Współpraca w zakresie utleniania węglowodorów alkiloaromatycznych do cennych produktów (hydroksyarymatów, nadtlenców, alkoholi, ketonów) zaowocowała 7 patentami (2 polskimi, 2 europejskimi, 2 USA oraz 1 chińskim) [54].

Opracowaliśmy także prostą metodę analityczną równoczesnego oznaczania wodoronadtlenku kumenu i nadtlenu dikumylowego w mieszaninie [55].

Równolegle uczestniczyłam w pracach badawczych na zlecenie przemysłu polskiego, których wynikiem było opracowanie technologii wytwarzania 4,4'-diaminodifenylosulfonu oraz metody odsiarczania benzenu koksochemicznego na drodze selektywnego chlorowania. W przypadku technologii wytwarzania 4,4'-diaminodifenylosulfonu – utwardzacza żywic epoksydowych – wykonane zostały próby wielkolaboratoryjne 25 kg/szarzę (Zakłady Chemiczne Blachownia oraz Zakłady Tworzyw Sztucznych "Erg" w Gliwicach) oraz wybudowana instalacja techniczna.

W latach 2005-2008, w ramach grantu „Sieciowanie elastomerów nowymi nadtlenkami organicznymi” (nr 3T09B 08229), we współpracy z Politechniką Łódzką, uczestniczyłam w badaniach nad syntezą nowych substancji nadtlenowych, pochodnych 2-izopropylonaftalenu i 2,6-diizopropylonaftalenu oraz ich wykorzystaniem w procesach sieciowania [56,57].

- 
53. Zawadiak J., **Gilner D.**, The Products of Catalytic Oxidation of Cumene with Oxygen in Liquid Phase, *Pol. J. Appl. Chem.*, **1997**, 41(3), 169-178.
54. Zawadiak J., Stec Z., Knips U., Zellerhoff R., **Gilner D.**, Orlińska B., Polaczek J., "Sposób katalitycznego utleniania węglowodorów izoalkiloaromatycznych", Patent Polski **PL 182 675** (28.02.2002); Stec Z., Zawadiak J., Knips U., Zellerhoff R., **Gilner D.**, Orlińska B., Polaczek J., Tecza W., Machowska Z., "Process for the production of hydroxy-aromatic substances" **Patent Chiński 82 412** (13.03.2002); Stec Z., Zawadiak J., Knips U., Zellerhoff R., **Gilner D.**, Orlińska B., Polaczek J., Tecza W., Machowska Z., "Sposób wytwarzania  $\beta$ -naftolu", Patent Polski **PL 181 496** (31.07.2001); Stec Z., Zawadiak J., Knips U., Zellerhoff R., **Gilner D.**, Orlińska B., Polaczek J., Tecza W., Machowska Z., "Verfahren zur Herstellung von beta-Naphthol", **Patent Europejski EP 0 796 833** (05.09.2001); Zawadiak J., Stec Z., Knips U., Zellerhoff R., **Gilner D.**, Orlińska B., Polaczek J., "Vehrfaren zur Oxidation isoalkyl-aromatischer Kohlenwasserstoffe und Katalysator zur Durchführung des Verfahrens", **Patent Europejski EP 0 796 835 B1** (17.05.2000); Stec Z., Zawadiak J., Knips U., Zellerhoff R., **Gilner D.**, Orlińska B., Polaczek J., Tecza W., Machowska Z., "Process for the production of hydroxy-aromatic substances", **Patent USA 6 107 527** (22.08.2000); Zawadiak J., Stec Z., Knips U., Zellerhoff R., **Gilner D.**, Orlińska B., Polaczek J. "Process for the oxidation of isoalkylaromatic hydrocarbons, and catalyst for the execution of the process", **Patent USA 5 990 357** (23.11.1999).
55. Zawadiak J., **Gilner D.**, Kulicki Z., Baj S., Concurrent Iodimetric Determination of Cumene Hydroperoxide and Dicumenyl Peroxide Used for Reaction Control in Dicumenyl Peroxide Synthesis, *Analyst*, **1993**, 118 (8), 1081-1083.
56. Zaborski M., Skurska M., Przybyszewska M., Pingot T., Zawadiak J., Orlińska B., **Gilner D.**, *Polimery*, **2010**, 55, 293-298.
57. **Gilner D.**, Orlińska B., Stec Z., Zawadiak J., Zaborski M., Przybyszewska M., Skurska M., *Przem. Chem.*, **2010**, 89, 151-157.

Tematyka badawcza obejmowała również syntezę i właściwości bis-nadtlenków organicznych [58]. Część nadtlenków została wykorzystana do otrzymania polimerów blokowych specjalnego przeznaczenia we współpracy z prof. Aleksandrem Zaichenko z Politechniki Lwowskiej [59].

W ostatnich kilku latach uczestniczę w badaniach procesów utleniania i modyfikacji poliolefin tlenem, realizowanych m.in. w ramach projektów celowego (6 ZR7 2007C/06846) i rozwojowego (05-0085-10/2010) kierowanych przez prof. Jana Zawadiaka. Opracowana technologia utleniania polietylenu wysokiej gęstości w fazie stałej (jako wynik realizacji grantu celowego) została wdrożona najpierw na skalę pilotową w firmie Euroceras w Kędzierzynie Koźlu, a następnie w roku 2010, na zasadzie umowy sprzedaży Know-How, została wybudowana instalacja produkcyjna (300-500t/rok) w firmie Keim-Additec GmbH w Niemczech.

Od roku 2010 jestem wykonawcą projektu „Biotransformacje użyteczne w przemyśle farmaceutycznym i kosmetycznym”, POIG.01.03.01-00-158/09-00 (Program Operacyjny Innowacyjna Gospodarka; 2010-2014), gdzie realizuję tematykę związaną z zastosowaniem immobilizowanych enzymów, w postaci ciągłych mikroreaktorów o kontrolowanej nanostrukturze, w procesach rozdziału kinetycznego racematów. Moje badania dotyczą rozdziału mieszaniny racemicznej 3-amino-1,2-propanodiolu oraz jego pochodnych, z zastosowaniem natywnych i immobilizowanych lipaz. Najlepsze wyniki ( $ee_R = 96\%$ ) uzyskałam w procesie kinetycznego rozdziału mieszaniny racemicznej *N*-(2,3-dihydroksypropylo)ftalimidu wobec lipazy z trzustki wieprzowej, immobilizowanej na modyfikowanej krzemionce [60, 61].

*Danuta Gillner*

- 
58. Kuźnik N., Zawadiak J., **Gilner D.**, Więckol A., Wagner P., Kubicki M., 1,4-Bis[(1-methyl-1-phenylethyl)-peroxymethyl]benzene, *Acta Crystallographica*, **2002**, C58, o549-o550.
59. Zaichenko A., Mitina N., Rayewska K., Skorohoda T., Zawadiak J., **Gilner D.**, Lobaz V., Novikov V., Design of polymers of block, comb-like and highly branched structures with peroxide containing chains, *Chemistry & Chemical Technology*, **2007**, 1(2), 71-78.
60. **Gillner D.**, Walczak K., Brzęczek A., Matejaszczyk K., Szymańska K., Jarzębski A., Rozdział mieszaniny racemicznej 3-amino-1,2-propanodiolu wobec lipaz, *54 Zjazd PTCHEM i SITPCHEM, Lublin, 18-22.09.2011r.*
61. **Gillner D.**, Walczak K., Kałuża A., Szymańska K., Jarzębski A., Lipazy w rozdziale mieszaniny racemicznej pochodnych 3-amino-1,2-propanodiolu, *7 Kongres Technologii Chemicznej, Kraków 8-12.07.2012r.*