

AUTOREFERAT

1. Imię Nazwisko

Dawid Siodłak

2. Posiadane stopnie naukowe

1995	Magister chemii, Wydział Matematyki, Fizyki i Chemii, Uniwersytet Opolski, Opole
2004	Doktor nauk chemicznych, Wydział Matematyki, Fizyki i Chemii, Uniwersytet Opolski, Opole, rozprawa doktorska pt. <i>N',N'</i> -dimetyloamidy <i>N</i> -acetylo- α,β -dehydroaminokwasów: synteza, konformacja, asocjacja

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu

1995 – 2004	Asystent, Instytut Chemii, Wydział Matematyki, Fizyki i Chemii, Uniwersytet Opolski
2004 – 2008	Adiunkt, Instytut Chemii, Wydział Matematyki, Fizyki i Chemii, Uniwersytet Opolski
2008 – obecnie	Adiunkt, Wydział Chemii, Uniwersytet Opolski

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

Osiągnięciem naukowym jest jednotematyczny cykl dwunastu publikacji

a) tytuł osiągnięcia naukowego:

Określenie właściwości konformacyjnych podstawowych modyfikacji
naturalnych α,β -dehydroaminokwasów

b) wykaz publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego uporządkowany według kolejności omawiania

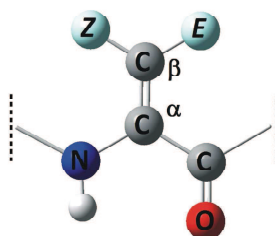
- H1 Siodłak, D.*
 α,β -Dehydroamino acids in naturally occurring peptides. *Amino Acids* DOI: 10.1007/s00726-014-1846-4
- H2 Macedowska, A.; Siodłak, D.; Rzeszotarska, B.*
Conformational properties of *N*-acetyl-*N*-methyl- α,β -dehydroalanine *N'*-methylamide. *Acta Biochimica Polonica* **2006**, *53*, 227–232.
- H3 Siodłak, D.;* Gajewska, M.; Macedowska, A.; Rzeszotarska, B.
Conformational studies into *N*-methylation of alanine diamide models: A quantitative approach. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM* **2006**, *775*, 47–59. DOI: 10.1016/j.theochem.2006.07.021
- H4 Siodłak, D.;* Macedowska-Capiga, A.; Grondys, J.; Paczkowska, K.; Rzeszotarska, B.
N-Methyldehydroamino acids promote a configuration *cis* of *N*-methylamide bond. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM* **2008**, *851*, 100–108. DOI: 10.1016/j.theochem.2007.11.001
- H5 Siodłak, D.;* Macedowska-Capiga, A.; Ejsmont, K.; Zaleski, J.; Rzeszotarska, B.
The conformation *cis* of *N*-acetyl-*N*-methyl- α,β -dehydroalanine *N'*-methylamide and saturated analogues. *Zeitschrift für Kristallographie* **2007**, *222*, 297–305. DOI:10.1524/zkri.2007.222.6.297
- H6 Siodłak, D.;* Macedowska-Capiga, A.; Broda, M. A.; Koziół, A. E.; Lis, T.
The *cis-trans* isomerization of *N*-methyl- α,β -dehydroamino acids. *Biopolymers (Peptide Science)* **2012**, *98*, 466–478. DOI: 10.1002/bip.22082
- H7 Siodłak, D.;* Grondys, J.; Lis, T.; Bujak, M.; Broda, M. A.; Rzeszotarska, B.
The conformational properties of dehydrobutyrine and dehydrovaline: theoretical and solid state conformational studies. *Journal of Peptide Science* **2010**, *16*, 496–505. DOI: 10.1002/psc.1267
- H8 Buczek, A.; Siodłak, D.; Bujak, M.; Broda M. A.*
Effects of side-chain orientation on the backbone conformation of the dehydrophenylalanine residue. Theoretical and X-ray study. *The Journal of Physical Chemistry B* **2011**, *115*, 4295–4306. DOI: 10.1021/jp200949t
- H9 Siodłak, D.;* Grondys, J.; Broda, M. A.
The conformational properties of α,β -dehydroamino acids with a C-terminal ester group. *Journal of Peptide Science* **2011**, *17*, 690–699. DOI: 10.1002/psc.1390
- H10 Siodłak D.;* Bujak, M.; Staś, M.
Intra- and intermolecular forces dependent main chain conformations of esters of α,β -dehydroamino acids. *Journal of Molecular Structure* **2013**, *1047*, 229–236. DOI:10.1016/j.molstruc.2013.04.078
- H11 Siodłak, D.;* Janicki, A.
Conformational properties of the residues connected by ester and methylated amide bonds. Theoretical and solid state conformational studies. *Journal of Peptide Science* **2010**, *16*, 126–135. DOI: 10.1002/psc.1208
- H12 Siodłak, D.;* Staś, M.; Broda, M. A.; Bujak, M.; Lis, T.
Conformational properties of oxazole-amino acids: Effect of the intramolecular N–H \cdots N hydrogen bond. *The Journal of Physical Chemistry B* **2014**, *118*, 2340–2350. DOI: 10.1021/jp4121673

Oświadczenia wszystkich współautorów, określające indywidualny wkład w powstanie powyższych publikacji znajdują się w załączniku nr 5.

c) omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Wprowadzenie

Dehydroaminokwasy należą do niestandardowych aminokwasów, których charakterystyczną cechą jest wiązanie podwójne pomiędzy atomami węgla. W większości struktur, takie wiązanie podwójne występuje pomiędzy atomem węgla α w łańcuchu głównym, a atomem węgla β w łańcuchu bocznym. Zatem termin dehydroaminokwasy, chociaż o szerszym znaczeniu, dotyczy zasadniczo α,β -didehydro- α -aminokwasów, powszechnie zwanych krócej α,β -dehydroaminokwasami, i tak zostało przyjęte w niniejszej pracy (Schemat 1).



Schemat 1. Ogólny wzór reszty α,β -dehydroaminokwasu z wyszczególnieniem położenia łańcucha bocznego w pozycji Z i E.

Hybrydyzacja sp^2 atomu węgla α powoduje, że α,β -dehydroaminokwas nie posiada asymetrii charakterystycznej dla nasyconych standardowych aminokwasów. Co więcej, geometria tworzonych wiązań jest trygonalna: wiązania są krótsze, a wartości kątów walencyjnych większe w stosunku do tych tworzonych przez atom węgla o hybrydyzacji sp^3 . Analogicznie, hybrydyzacja sp^2 atomu węgla β , i jednocześnie tworzenie wiązania podwójnego z atomem węgla α , powoduje ograniczenie rotacji łańcucha bocznego do dwóch położenia, opisywanych izomerią geometryczną Z/E. Możliwa koplanarność wiązania $C^\alpha=C^\beta$ oraz sąsiednich wiązań peptydowych generuje sprzężenie π -elektronowe w obrębie reszty α,β -dehydroaminokwasu, które może stabilizować pewne konformacje.^[1] Wiązanie $C^\alpha=C^\beta$ ma zatem istotny wpływ na odmienną właściwość konformacyjnych α,β -dehydroaminokwasów w odniesieniu do standardowych aminokwasów. Tym samym zasadne jest sądzić, że α,β -dehydroaminokwasy mogą mieć wpływ na biologiczną konformację związku, w którego skład wchodzi.

Nie bez znaczenia dla biologicznej aktywności α,β -dehydroaminokwasów jest reaktywność podwójnego wiązania, które może ulegać przede wszystkim addycji Michaela,^[2] izomeryzacji Z/E,^[3,4] uwodornieniu,^[5-8] czy cykloaddycji.^[9]

Występowanie α,β -dehydroaminokwasów w naturze

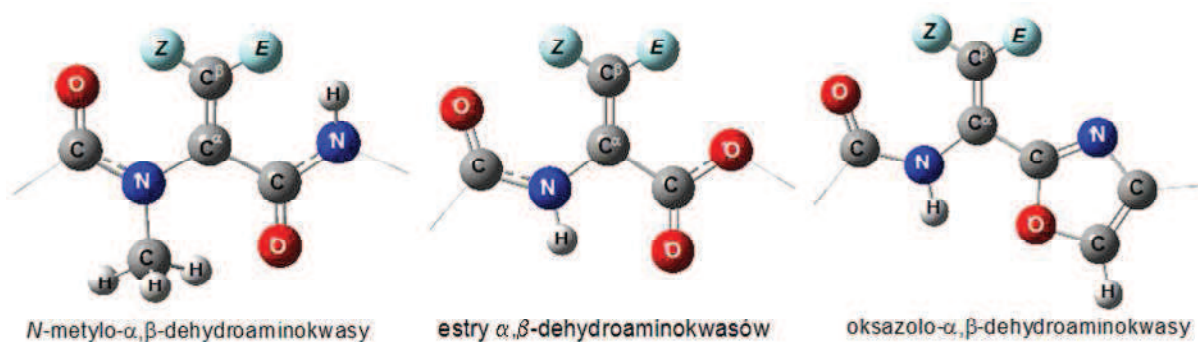
α,β -Dehydroaminokwasy można spotkać zarówno w prostych związkach, jak pochodne piperazyny,^[10] czy tak złożonych jak białka.^[11,12] Jednak podstawowym źródłem α,β -dehydroaminokwasów są peptydy, zwane dalej dehydropeptydami. Z dostępnych artykułów przeglądowych całościowy obraz występowania α,β -dehydroaminokwasów w naturze przedstawia jedynie praca Nody i współautorów z 1983 roku.^[10] Pozostałe prace przeglądowe dotyczą jedynie trzech dużych rodzin dehydropeptydów: lantibiotyków,^[13-15] tiopeptydów^[16,17] oraz mikrocytyn.^[18,19]

Po uzyskaniu stopnia doktora nauk chemicznych, w celu sprecyzowania dalszej tematyki badawczej, przystąpiłem do kompletowania danych literaturowych dotyczących występowania α,β -dehydroaminokwasów w naturze. Efektem jest artykuł przeglądowy [H1], chronologicznie najnowszy z jednotematycznego cyklu publikacji, ze względu na czas potrzebny do opracowania obszernych danych. Usystematyzowałem w nim aktualną wiedzę dotyczącą biologicznego źródła pochodzenia dehydropeptydów, ich biologicznej aktywności, oraz budowy, w tym rodzaju występującego α,β -dehydroaminokwasu. Z zebranych prac wynika, że dehydropeptydy są produkowane zasadniczo przez bakterie, w mniejszym stopniu przez grzyby. Zostały również wyizolowane z organizmów morskich bezkręgowców oraz wyższych roślin, jednak w tych przypadkach istnieją przesłanki, aby sądzić, że nie są one ich pierwotnym źródłem. Dehydropeptydy wykazują zasadniczo działanie przeciwbakteryjne, ale także przeciwgrzybiczne, przeciwnowotworowe, i fitotoksyczne. Z tego powodu traktowane są jako potencjalne prekursorzy nowych leków. Często dehydropeptydy wykazują szerokie spektrum aktywności biologicznej. Efektem mojej pracy jest opisanie przeszło 60 odmiennych struktur dehydropeptydów, które często reprezentują mniejszą lub większą grupę związków o charakterystycznej budowie. Usystematyzowanie dehydropeptydów według ich strukturalnego podobieństwa pozwala na przewidywanie potencjalnej aktywności biologicznej dla tych związków z danej grupy, dla których nie przeprowadzono odpowiednich badań. Niektóre dehydropeptydy występują w literaturze pod kilkoma synonimami. Istnieją również takie, które traktowano jako strukturalnie odmienne, a które okazały się być homologami. Ogółem zidentyfikowałem 37 reszt α,β -dehydroaminokwasowych różniących się: konstytucją łańcucha bocznego, geometrią *Z/E* jego położenia oraz modyfikacjami łańcucha głównego w obrębie reszty α,β -dehydro-aminokwasów. Warto podkreślić, że liczba znalezionych α,β -dehydroaminokwasów znacznie przewyższa zbiór standardowych aminokwasów. Kilka przykładów pokazuje, że obecność α,β -dehydroaminokwasu ma istotny,

lub nawet decydujący wpływ na aktywność biologiczną peptydu.^[8,20-22] Co więcej, istnieją przykłady które pokazują, że zmiana jedynie położenia łańcucha bocznego w pozycji *Z* bądź *E* może decydować o aktywności biologicznej związku.^[6,7,23] Zatem izomer geometryczny danego aminokwasu tym bardziej należy traktować jako osobną jednostkę strukturalną.

Najczęściej występującymi w przyrodzie α,β -dehydroaminokwasami są dehydroalanina oraz dehydrobutyryna. Wynika to z faktu, że powstają one w wyniku β -eliminacji standardowych aminokwasów: seryny, cysteiny oraz treoniny. Dehydroalanina oraz dehydrobutyryna mają istotne znaczenie w poznaniu właściwości konformacyjnych α,β -dehydroaminokwasów. Dehydroalanina jest najprostszym dehydroaminokwasem, pierwszym w szeregu homologicznym, który jednocześnie nie wykazuje izomerii geometrycznej. Dehydrobutyryna jest kolejnym w szeregu homologicznym, a jednocześnie pierwszym α,β -dehydroaminokwasem, dla którego możliwa jest izomeria *Z/E*. Izomery geometryczne α,β -dehydroaminokwasów występują w naturze, przy czym rysuje się przewaga stabilniejszego termodynamicznie izomeru *Z*.^[3,24]

Zebrane dane ujawniają trzy główne modyfikacje występujących w naturze α,β -dehydroaminokwasów: *i*) metylowane wiązanie amidowe od strony N-końca, *ii*) wiązanie estrowe w miejsce wiązania amidowego od strony C-końca, *iii*) obecność pierścienia heterocyklicznego, głównie oksazolowego, również od strony C-końca (**Schemat 2**). Określenie właściwości konformacyjnych takich modyfikowanych α,β -dehydroaminokwasów jest zasadniczym celem przedstawianej pracy.



Schemat 2. Ogólny schemat trzech podstawowych modyfikacji α,β -dehydroaminokwasów.

Zainteresowanie tego typu modyfikacjami było naturalną konsekwencją wcześniej realizowanej tematyki mojej pracy doktorskiej, dotyczącej metylowania α,β -dehydroaminokwasów na wiązaniu amidowym od strony C-końca. W znacznej mierze miałem też opracowaną metodykę badawczą.

***N*-Metylo- α,β -dehydroaminokwasy**

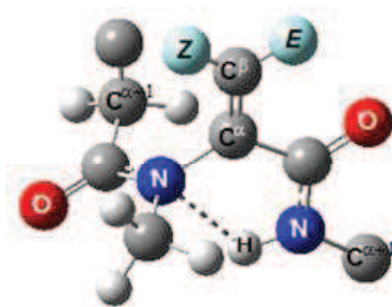
W przypadku naturalnych α,β -dehydroaminokwasów metylowanie wiązania peptydowego występuje zasadniczo od strony N-końca. Przykładami są: *i*) *N*-metylodehydroalanina, $\Delta(\text{Me})\text{Ala}$, która wchodzi w skład mikrocystyn,^[18] oraz strukturalnie bliskich sobie cyklodepsipeptydów: FR900359^[25] i YM-254890-3^[26], *ii*) *N*-metylo-(*Z*)-dehydrobutyryna, (*Z*)- $\Delta(\text{Me})\text{Abu}$, która tworzy nodularyny,^[18] o podobnej strukturze i funkcji do mikrocystyn, *iii*) *N*-metylo-(*Z*)-dehydrofenyloalanina, (*Z*)- $\Delta(\text{Me})\text{Phe}$, która znajduje się w tentoksynie.^[27] Właściwości konformacyjne *N*-metylo- α,β -dehydroaminokwasów, $\Delta(\text{Me})\text{Xaa}$, nie były dotychczas opisane.

Jedynym znanym przykładem, w którym naturalny α,β -dehydroaminokwas, (*Z*)- ΔAbu , jest metylowany na wiązaniu peptydowym od strony C-końca jest mutremdamid A.^[28] Badania konformacyjne takich α,β -dehydroaminokwasów były przedmiotem wcześniejszych opracowań zespołu opolskiego, i jednocześnie przedmiotem mojej pracy doktorskiej.

Realizację badań właściwości konformacyjnych *N*-metylo- α,β -dehydroaminokwasów, w ramach pracy habilitacyjnej, rozpocząłem od uzyskania projektu badawczego własnego N20415731/3572 (2006-10-26; 2008-04-25) „*N*-Metylo- α,β -dehydroaminokwasy jako komponenty małych cyklicznych toksyn peptydowych: synteza i studia konformacyjne”.

Do określenia właściwości konformacyjnych *N*-metylo- α,β -dehydroaminokwasów, wybrałem ich proste modelowe związki *N*-acetylo-*N'*-metyloamidy, $\text{Ac}-\Delta(\text{Me})\text{Xaa}-\text{NHMe}$. Analizowałem zasadniczo reszty *N*-metylo- α,β -dehydroaminokwasów występujących w przyrodzie: $\Delta(\text{Me})\text{Ala}$, (*Z*)- $\Delta(\text{Me})\text{Abu}$, oraz (*Z*)- $\Delta(\text{Me})\text{Phe}$, ale także (*E*)- $\Delta(\text{Me})\text{Abu}$, (*E*)- $\Delta(\text{Me})\text{Phe}$ oraz $\Delta(\text{Me})\text{Val}$.

W pierwszej kolejności zastosowałem metody obliczeniowe. Badania te realizowałem we współpracy z magistrantkami: Agnieszką Macedowską-Capigą (później doktorantką), Katarzyną Paczkowską i Justyną Grondys, pełniąc rolę opiekuna technicznego ich prac. Uzyskane wyniki opracowałem w formie dwóch publikacji [**H2,H3**], w których wykazałem, że *N*-metylo- α,β -dehydroaminokwasy preferują konformacje z konfiguracją *cis* metylowanego wiązania peptydowego od strony N-końca ($\varpi_0 \sim 0^\circ$). Dla $\Delta(\text{Me})\text{Ala}$, (*Z*)- $\Delta(\text{Me})\text{Abu}$, (*E*)- $\Delta(\text{Me})\text{Abu}$, $\Delta(\text{Me})\text{Val}$, oraz (*Z*)- $\Delta(\text{Me})\text{Phe}$, najbardziej stabilną konformacją jest *cis* C7eq o kątach torsyjnych ϕ i ψ wynoszących odpowiednio -105° i 8° (Schemat 3).



Schemat 3. Ogólny schemat konformacji *cis* C7eq *N*-metylo- α,β -dehydroaminokwasów.

Konformacja *cis* C7eq jest preferowana nie tylko w przypadku izolowanych molekuł (*in vacuo*), lecz także w środowisku o różnej polarności, które symulowano stosując w obliczeniach otoczenie chloroformu lub wody. Geometria tej konformacji zasadniczo nie zależy także od typu badanego łańcucha bocznego. Wyjątkiem jest izomer *E* *N*-metylo- α,β -dehydrofenyloalaniny, (*E*)- Δ (Me)Phe, który wykazuje nieco inne właściwości, preferując konformację *cis* α_D ($\phi, \psi = 119^\circ, 126^\circ$).

Równie ciekawym wynikiem jest przewidywana większa swoboda konformacyjna w przypadku przyjęcia konfiguracji *trans* *N*-metylowanego wiązania amidowego od strony *N*-końca. Obszary konformacji z konfiguracją *trans* są większe, z czego wynika, że stosunkowo niewielki nakład energii powoduje większe zmiany w geometrii konformacji (wartościach kątów ϕ i ψ). Reszta *N*-metylo- α,β -dehydroaminokwasu może być zatem stosunkowo giętkim elementem strukturalnym.

W celu potwierdzenia przedstawionych wyników metodami eksperymentalnymi, zsyntezowałem modelowe diamidy *N*-metylo- α,β -dehydroaminokwasów, Ac- Δ (Me)Xaa-NHMe, z ich analogów niemetylowanych, Ac- Δ Xaa-NHMe, które z kolei otrzymano metodami stosowanymi w zespole opolskim.^[29] Wiązanie amidowe od strony *N*-końca metylowano selektywnie adaptując metodę opisaną przez Rich'a i Tam'a.^[30] Natomiast izomer geometryczny *E* dehydrofenyloalaniny uzyskano z izomeru *Z* w procesie fotoizomeryzacji, adaptując metodę opisaną dla izotentoksyny.^[23] Pracę tę wykonałem razem z doktorantką Agnieszką Macedowską-Capigą, która była wykonawcą kierowanego przeze mnie projektu badawczego.

W celu zbadania konformacji zsyntezowanych związków przyjmowanych w kryształach, nawiązałem współpracę z prof. Jackiem Zaleskim i dr hab. Krzysztofem Ejsmontem, a w dalszym etapie z dr hab. Anną Kozioł oraz prof. Tadeuszem Lisem. Rentgenowska analiza strukturalna wykazała, że wszystkie badane związki przyjmują w kryształach konformacje z wiązaniem peptydowym od strony *N*-końca w konfiguracji *cis*. Dla pochodnych Δ (Me)Ala, (*Z*)- Δ (Me)Abu, oraz (*Z*)- Δ (Me)Phe, jest to konformacja *cis* C7eq,

natomiast w przypadku (*E*)- Δ (Me)Phe jest to konformacja *cis* α D. Należy podkreślić dużą korelację wyników uzyskanych za pomocą rentgenowskiej analizy strukturalnej z wynikami uzyskanymi metodami obliczeniowymi. Molekuły realizują konformację o geometrii zbliżonej do tej przewidywanej metodami teoretycznymi, i jednocześnie przewidywaną jako najbardziej stabilną. W przypadku reszty (*E*)- Δ (Me)Phe widoczna jest znowu jej pewna odmienność.

Badania właściwości konformacyjnych w roztworze przeprowadziłem wykorzystując metody NMR oraz FT-IR. Na widmach NMR w roztworze CDCl₃ oraz DMSO-*d*₆ widoczne jest zjawisko zdublowania pasm, świadczące o występowaniu wiązania amidowego od strony N-końca w dwóch konfiguracjach: *cis* i *trans*. Przypisanie sygnałów do odpowiednich konfiguracji wykonałem za pomocą eksperymentu NOE, opierając się na odległości grup metylowych wiązania amidowego od strony N-końca (acetylowej oraz na atomie azotu) do atomów wodoru łańcucha bocznego w pozycji *Z*. Odległość ta jest zależna od przyjmowanej konfiguracji. Analiza potwierdziła przewagę występowania konfiguracji *cis*.

Podobne rezultaty uzyskano z analizy widm FT-IR. Na tym etapie badań współpracowałem z dr hab. Małgorzatą Brodą. Analizując pasma amid I w regionie 1700-1600 cm⁻¹, w środowisku chloroformu oraz acetonitrylu, wyodrębniono jego trzy podstawowe składowe: 1680-1670, 1671-1667 oraz 1663-1659 cm⁻¹. Porównanie do wcześniej zbadanych analogów,^[31,32] niemetylowanych dehydroaminokwasów, Ac- Δ Xaa-NHMe pokazało, że składowa pasma 1680-1670 cm⁻¹ pochodzi od wiązania amidowego od strony C-końca. Zatem pozostałe dwie składowe pochodzą od wiązania amidowego od strony N-końca. Obniżenie częstości tych składowych jest typowe dla amidu trzeciorzędowego, co potwierdzono przez porównanie do wcześniej badanych przez nasz zespół analogów z metylovanym wiązaniem od strony C-końca, Ac- Δ Xaa-NHMe₂.^[33] Przypisanie składowej pasma 1663-1659 cm⁻¹ do konfiguracji *cis* oparto na danych uzyskanych dla (*E*)- Δ (Me)Phe z widma FT-IR w acetonitrylu, w którym tylko te pasmo jest obecne w badanym zakresie, oraz widmie NOE w DMSO, w którym widoczna jest tylko konfiguracja *cis*. DMSO oraz acetonitryl wykazują podobne stałe dielektryczne i momenty dipolowe, tym samym uznałem, że (*E*)- Δ (Me)Phe będzie przyjmować w nich podobne konformacje. Przedstawione powyżej wyniki eksperymentalne zebrałem w dwóch pracach [H4,H5].

Równowaga *cis-trans* wiązania amidowego jest zależna od wielu czynników.^[3] Wiadomo, że zarówno zawada steryczna, jak i nienasycony charakter podstawnika wpływa na obniżenie

bariery rotacji wiązania amidowego, i tym samym zwiększa populację konfiguracji *cis*.^[33-36] Oba te czynniki występują w przypadku *N*-metylo- α,β -dehydroaminokwasów. Wydaje się jednak, że efekt steryczny odgrywa decydującą rolę (Schemat 3). Atom węgla α dehydroaminokwasu posiada hybrydyzację sp^2 , co skutkuje krótszymi wiązaniami, jednocześnie planarną geometrią jego podstawników. Z tego powodu wprowadzenie grupy metylowej w miejsce atomu wodoru powoduje większe zatłoczenie steryczne aniżeli w przypadku analogicznych nasyconych aminokwasów. Aby zmniejszyć te zatłoczenie steryczne korzystniej jest umieścić obie grupy alkilowe naprzeciwległe, czyli w konfiguracji *cis* wiązania amidowego. Z kolei nienasycony podstawnik ($C^\alpha=C^\beta$) jest ustawiony w taki sposób, że płaszczyzny wiązania amidowego od strony N-końca oraz wiązania podwójnego znajdują się prostopadle do siebie. Jednocześnie umożliwia to komplanarność wiązania podwójnego oraz wiązania amidowego od strony C-końca, co daje dodatkową siłę stabilizującą w postaci sprzężenia π -elektronowego. Taka geometria molekuly jest realizowana właśnie w konformacji *cis* C_{7eq} . Podstawnik w łańcuchu bocznym w pozycji *Z* znajduje się nad wiązaniem amidowym od strony N-końca i nie zaburza tego układu. Dlatego konformacja *cis* C_{7eq} jest przyjmowana zarówno przez reszty dehydroalaniny, jak i *Z*-dehydrobutyryny, czy *Z*-dehydrofenyloalaniny. Natomiast w przypadku *E*-dehydrofenyloalaniny, grupa fenylowa łańcucha bocznego znajduje się nad wiązaniem amidowym od strony C-końca. Nie zaburza to wprawdzie układu przestrzennego od strony N-końca, stąd ciągle tendencja do przyjmowania konfiguracji *cis*, natomiast utrudnia ona realizację sprzężenia π -elektronowego od strony C-końca, co wymusza przyjęcie nieco innej konformacji, *cis* α_D .

Zjawisko przyjmowania konfiguracji *cis* przez wiązanie amidowe od strony N-końca *N*-metylo- α,β -dehydroaminokwasów jest znane w naturze. Występuje w cyklotetrapeptydzie tentoksynie^[5,37] oraz w cyklopentapeptydzie nodularynie.^[38-40] Natomiast w większych peptydach, jak cykloheptapeptydowych mikrocystynach^[41-43] czy FR900359^[25] metylowane wiązanie amidowe występuje w konfiguracji *trans*. Nie było zatem wiadome, czy tendencja do przyjmowania konfiguracji *cis* jest swoistą własnością *N*-metylo- α,β -dehydroaminokwasów, czy jest rezultatem wymogów strukturalnych małych cyklicznych związków. Przedstawione wyniki badań potwierdzają, że *N*-metylo- α,β -dehydroaminokwasy mają zdecydowaną tendencję do przyjmowania konfiguracji *cis* *N*-metylowanego wiązania amidowego, bez względu na rodzaj środowiska oraz typ aminokwasu. Zaznacza się również pewna odmienność preferencji konformacyjnych (*E*)- Δ (Me)Phe, co może tłumaczyć dlaczego semi-syntetyczna izotentoksyna nie wykazuje biologicznej funkcji takiej jak tentoksyna.^[23]

***N*-Metylo- α -aminokwasy**

W celu potwierdzenia unikalnych właściwości konformacyjnych *N*-metylo- α,β -dehydroaminokwasów, postanowiłem określić również właściwości konformacyjne ich analogów nasyconych, *N*-metylo- α -aminokwasów. Obliczenia oraz syntezę, prowadziłem razem z doktorantką Agnieszką Macedowską-Capigą oraz magistrantką Moniką Gajewską, w ramach opieki technicznej nad ich pracami.

Poza celem porównawczym, badania właściwości konformacyjnych metylowanych aminokwasów stanowią pewną odrębną całość, które ująłem w osobnej publikacji [H6]. Zgodność wcześniej omawianych wyników uzyskanych metodami obliczeniowymi oraz za pomocą rentgenowskiej analizy strukturalnej nasunął pomysł opracowania map konformacyjnych modelowych związków z jednoczesną analizą dystrybucji konformacji przyjmowanych przez metylowane reszty aminokwasowe w kryształach, korzystając z bazy krystalograficznej CSD.^[44] W ten sposób mogłem zweryfikować stosowane metody obliczeniowe, i jednocześnie, uzyskać w miarę całościowy obraz preferencji konformacyjnych metylowanych aminokwasów (wyłączając prolinę i glicynę). Poszerzyłem również zakres badań o reszty aminokwasowe z metylowanym wiązaniem peptydowym nie tylko od strony N-końca, lecz również od strony C-końca, oraz zarówno N-, jak i C-końca. Takie reszty aminokwasowe występują w naturalnych peptydach, w których wiele wiązań amidowych jest metylowanych, przykładem jest cyklosporyna.

Z otrzymanych rezultatów wynika, że wprowadzenie grupy metylowej do wiązania peptydowego od strony N-końca lub C-końca, powoduje ograniczenie swobody konformacyjnej, co jest zgodne z dotychczasowym stanem wiedzy.^[45] Jednak w przeprowadzonych badaniach wykazano to zarówno przez zmniejszenie ogólnej liczby konformacji lub konformacji o niskiej energii, jak również poprzez porównanie dostępnej powierzchni map konformacyjnych w granicach danej wartości energii potencjalnej. Wykazano również, że metylowanie obu wiązań amidowych zwiększa swobodę konformacyjną w obrębie tak zmodyfikowanej reszty aminokwasowej, co stanowi nowość i nie było do tej pory publikowane.

Wykonana metodami teoretycznymi w ramach pracy [H6] analiza konformacyjna Ac-L-(Me)Ala-NHMe pokazuje, że w przeciwieństwie do *N*-metylo- α,β -dehydroaminokwasów, podstawową konformacją jest C_{7eq} , ale z konfiguracją *trans* wiązania amidowego od strony N-końca. Jednak z symulowanego wzrostu polarności środowiska wynika, że różnice w energii względnej pomiędzy konformacjami C_{7eq} z konfiguracją *trans*

oraz *cis* są małe. Zatem wzrost polarności otoczenia powinien przesuwac równowagę *cis-trans* na korzyść *cis* – odwrotnie niż w przypadku *N*-metylo- α,β -dehydroaminokwasów.

W celu dalszego potwierdzenia właściwości konformacyjnych *N*-metylo- α -aminokwasów metodami eksperymentalnymi, zsyntezowałem modelowy związek Ac-L-(Me)Ala-NHMe bazując na metodzie opisanej przez Aurelio i współpracowników.^[46] Podobnie jak w przypadku *N*-metylo- α,β -dehydroaminokwasów, w widma NMR wykonanych w roztworze CDCl₃ oraz DMSO-*d*₆ widoczne jest zjawisko zdublowania pasm świadczące o występowaniu dwóch form: *cis* i *trans*. Przypisanie sygnałów do odpowiednich konfiguracji wykonałem stosując eksperyment NOE, opierając się na fakcie, że w zależności od konfiguracji, różny jest dystans grup metylowych wiązania amidowego od strony N-końca (acetylowej oraz na atomie azotu) w stosunku do atomu wodoru α łańcucha głównego. Eksperyment pokazuje, że przeważa konfiguracja *trans*, w przeciwieństwie do *N*-metylo- α,β -dehydroaminokwasów. Natomiast wzrost polarności środowiska powoduje wzrost udziału formy *cis*. Zatem uzyskany wynik jest zgodny z przewidywanym metodami teoretycznymi. Podobne rezultaty uzyskano na podstawie widm FT-IR poprzez analizę składowych pasma amid I. W tym przypadku, przypisanie pasm odpowiedniej konfiguracji oparto na analizie częstości wyliczonych metodami teoretycznymi, z których wynikało, że pasmo AI(C=O) ma wyższe częstości dla wiązania amidowego w konfiguracji *trans* niż *cis*. Powyższe wyniki opracowałem jako element publikacji [H5], pokazując różnice pomiędzy właściwościami konformacyjnymi *N*-metylo- α,β -dehydro-aminokwasów i *N*-metylo- α -aminokwasów.

Rentgenowską analizę strukturalną kryształów zsyntezowanych modelowych związków, Ac-L-(Me)Ala-NHMe oraz Ac-DL-(Me)Ala-NHMe ująłem razem z Ac- Δ (Me)Ala-NHMe w osobnej pracy [H4]. Badania wykazały, że przyjmowana jest konfiguracja *cis* trzeciorzędowego wiązania amidowego. Jednak analiza konformacji reszt *N*-metylo- α -aminokwasów dostępnych w bazie krystalograficznej CSD pokazuje znaczną przewagę występowania konfiguracji *trans*. Tym niemniej, udział konfiguracji *cis* jest wyraźnie widoczny, w przeciwieństwie do niemetylowanych wiązań peptydowych [H6].

Podsumowując, na podstawie uzyskanych wyników badań wykazałem, że trzeciorzędowe wiązanie amidowe *N*-metylo- α -aminokwasów ma tendencję do występowania w konfiguracji *cis*, jednak nie w takim stopniu jak w przypadku *N*-metylo- α,β -dehydroaminokwasów.

α,β -Dehydroaminokwasy

Badania właściwości konformacyjnych *N*-metylo- α,β -dehydroaminokwasów, a także planowanych dalszych modyfikacji strukturalnych uwidoczniły braki w ogólnym obrazie preferencji konformacyjnych samych α,β -dehydroaminokwasów. W szczególności dotyczyło to dehydrobutyryny, najczęściej występującego w przyrodzie α,β -dehydroaminokwasu, ale także dehydrowaliny, czy nawet najczęściej badanej i publikowanej dehydrofenyloalaniny. Nie bez znaczenia był postęp, jaki dokonał się w dziedzinie technologii komputerowej w ciągu ostatniej dekady. Umożliwił on analizę właściwości konformacyjnych za pomocą metod obliczeniowych z uwzględnieniem otoczenia, jakie uprzednio nie były osiągalne.

W związku z tym postanowiłem podjąć badania modelowych *N'*-metyloamidów *N*-acetylo- α,β -dehydroaminokwasów, Ac- Δ Xaa-NHMe (Δ Xaa = (*Z*)- Δ Abu, (*E*)- Δ Abu, (*Z*)- Δ Phe, (*E*)- Δ Phe, Δ Val). Analizę właściwości konformacyjnych oparto na metodach obliczeniowych, a jednocześnie syntezie i rentgenowskiej analizie strukturalnej kryształów zsyntezowanych modelowych związków, włączając analizę konformacji analogicznych struktur dostępnych w literaturze. Obliczenia i syntezę modelowych związków, Ac-(*Z*)- Δ Abu-NHMe oraz Ac- Δ Val-NHMe, wykonała pod moim nadzorem doktorantka Justyna Grondys. Pomiary rentgenowskiej analizy strukturalnej kryształów wykonał prof. Tadeusz Lis. W celu ich opracowania nawiązałem dodatkowo współpracę z dr hab. Maciejem Bujakiem. Otrzymane efekty badań zebrałem w publikacji [H7]. W przypadku pochodnych dehydrofenyloalaniny, zbieżność z tematem badań dr hab. Małgorzaty Brody i jej doktorantki Anety Buczek doprowadziła do wspólnej publikacji [H8]. W tej pracy zasadniczo wykonałem syntezę Ac-(*E*)- Δ Phe-NHMe, oraz zanalizowałem konformacje w kryształach.

Do zrozumienia własności konformacyjnych α,β -dehydroaminokwasów konieczny jest krótki opis pierwszej w szeregu homologicznym dehydroalaniny, dość dobrze zbadanej już wcześniej, metodami teoretycznymi^[1,31] oraz eksperymentalnymi.^[31,47-50] Dehydroalanina wykazuje silną tendencję do przyjmowania w pełni rozciągniętej konformacji C_5 ($\varphi,\psi \sim -180^\circ, +180^\circ$), niezależnie od badanego środowiska. Można to uzasadnić stabilizacją osiąganą dzięki istnieniu wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych, N-H \cdots O oraz słabszego C-H \cdots O, a także występowania sprzężenia π -elektronowego obejmującego wiązanie podwójne oraz jednocześnie oba wiązania amidowe (Schemat 4). Krótki łańcuch boczny nie stanowi przeszkody sterycznej, jednocześnie jego charakter umożliwia występowanie wyżej wymienionych sił.



Schemat 4. Ogólny schemat konformacji C₅ α,β -dehydroalaniny.

Z przedłożonych prac [H7, H8] wyłania się generalny wniosek, że w przypadku α,β -dehydroaminokwasów z większym łańcuchem bocznym od dehydroalaniny, o właściwościach konformacyjnych decyduje w pierwszej kolejności nie tyle jego charakter co jego położenie w przestrzeni, w pozycji *Z* lub *E*. Izomery geometryczne *E*, dehydrobutyryny oraz dehydrofenyloalaniny, wykazują właściwości zbliżone do dehydroalaniny – mają tendencję do przyjmowania konformacji C₅. Jednak dla nich, różnica w relatywnej energii konformacji C₅ w stosunku do pozostałych konformacji jest mniejsza niż w przypadku dehydroalaniny. Zawada steryczna nakładana przez łańcuch boczny w położeniu *E* powoduje odkształcenie geometrii konformacji C₅ i tym samym osłabienie występujących w niej sił stabilizujących. Jest to widoczne w kryształach otrzymanej Ac-(*E*)- Δ Phe-NHMe [H7]. Dlatego, jak pokazują zarówno obliczenia, jak i skąpe dane krystalograficzne, w bardziej polarnym otoczeniu łatwo przyjmowane są też pozostałe konformacje. Mała liczba danych eksperymentalnych wynika zasadniczo z mniejszej stabilności izomerów *E*, w szczególności dehydrobutyryny, która wykazuje znaczną tendencję izomeryzacji do bardziej stabilnego izomeru *Z*.

W przypadku α,β -dehydroaminokwasów z łańcuchem bocznym w położeniu *Z*, obserwowana jest jeszcze mniejsza tendencja do przyjmowania konformacji C₅. Natomiast wraz ze wzrostem polarności otoczenia preferowane są konformacje helikalne: α ($\varphi, \psi \sim -70^\circ, -22^\circ$) oraz β ($\varphi, \psi \sim -46^\circ, +136^\circ$). Wykazano to zarówno metodami teoretycznymi, jak i analizą konformacji znajdujących w kryształach. Łańcuch boczny w położeniu *Z* powoduje zawadę steryczną w większym stopniu, aniżeli w położeniu *E*. W przypadku konformacji rozciągniętej C₅, *Z*-dehydrobutyryny, *Z*-dehydrofenyloalaniny oraz waliny, jest to widoczne w wartościach kąta torsyjnego φ , który w stosunku do wzorcowej dehydroalaniny odkształca się o około 50-60°. Taka zmiana geometrii konformacji C₅ znacząco osłabia wewnątrzcząsteczkowe wiązanie wodorowe N-H \cdots O oraz uniemożliwia realizację sprzężenia π -elektronowego w obrębie N-końca molekuly, przez co energia

konformacji wzrasta. Z tego powodu, dla izomerów *Z* α,β -dehydroaminokwasów charakterystyczna jest mała różnica w energii względnej pomiędzy konformacjami.

Drugi wniosek z przedłożonych prac [H7,H8] wynika z porównania właściwości konformacyjnych α,β -dehydroaminokwasów oraz standardowej alaniny. Okazuje się, że α,β -dehydroaminokwasy posiadają generalnie większą liczbę konformacji, w tym konformacji o niskiej energii. Uwzględnić tutaj należy fakt, że α,β -dehydroaminokwasy nie wykazują asymetrii charakterystycznej dla standardowych aminokwasów. Zatem każda omawiana konformacja posiada swój enancjomeryczny odpowiednik, posiadający taką samą energię, lecz o przeciwnych znakach kątów torsyjnych. Na przykład, nie można mówić o konformacji helikalnej α_R oraz α_L , o różnej energii, jak w przypadku standardowych aminokwasów. α,β -Dehydroaminokwasy posiadają konformację α oraz $-\alpha$, o przeciwnych znakach kątów torsyjnych, ale o tej samej energii. Konformacje α,β -dehydroaminokwasów są niejako zdublowane.

Przeprowadzone badania pozwoliły na doprecyzowanie ogólnego obrazu właściwości konformacyjnych α,β -dehydroaminokwasów. Dehydroalanina, najprostszy dehydroaminokwas, ze względu na oddziaływania realizowane w obrębie reszty, znacznie ogranicza konformacje łańcucha głównego. Pozostałe α,β -dehydroaminokwasy, jak dehydrobutyryna czy dehydrofenyloalanina, mają ograniczoną rotację łańcucha bocznego. Nie nakłada on jednak aż tak znacznych ograniczeń na konformacje łańcucha głównego. Nie można zatem sądzić, że generalnie α,β -dehydroaminokwasy usztywniają konformację peptydu. Tym niemniej właściwości konformacyjne α,β -dehydroaminokwasów są w większości przypadków dobrze sprecyzowane, w tym znaczeniu, że liczba oraz rodzaj konformacji nie ulegają zasadniczej zmianie pod wpływem otoczenia. Otoczenie, jego polarność, ma natomiast wpływ na relatywną energię konformacji. Stąd można powiedzieć, że α,β -dehydroaminokwasy charakteryzują się pewną stałością konformacyjną. Dodatkowo, ograniczenie położenia łańcucha bocznego do dwóch położen, *Z* lub *E*, powoduje, że każdy z izomerów geometrycznych będzie miał inne właściwości konformacyjne.

Przedstawione wyniki, mogą służyć wyjaśnieniu aktywności biologicznej naturalnych dehydropeptydów zawierających reszty *N*-metylo- α,β -dehydroaminokwasów. Przykładowo, reszta *N*-metylodehydroalaniny pełni istotną rolę w toksyczności mikrocystyny. Wiązanie podwójne pomiędzy atomami węgla α i β reaguje z tiolową grupą cysteiny fosfatazy 1 w addycji Michaela, wiążąc kowalencyjne toksynę z enzymem.^[2] Dawka LD50 dla mikrocystyny-LR wynosi 32.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (mysz).^[51] Jednakże dawka dla jej analogu

[Δ Ala⁷]microcystyny-LR, zawierającej niemetylowaną dehydroalaninę, jest zdecydowanie większa i wynosi 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$.^[20] To pokazuje, w jak istotny sposób metylowanie α,β -dehydroaminokwasu wpływa na biologiczną aktywność peptydu. Dehydroalanina ma zasadniczo odmienne właściwości konformacyjne od *N*-metylodehydroalaniny. Dehydroalanina, przez wyraźną tendencję do konformacji C_5 , jest elementem usztywniającym i ograniczającym konformację peptydu. *N*-Metylodehydroalanina posiada zdolność do przyjmowania konfiguracji *cis* metylowanego wiązania amidowego, a przy jego konfiguracji *trans* wykazuje znaczną swobodę w przyjmowaniu konformacji. Jest raczej giętkim elementem strukturalnym. Zatem cykloheptapeptydowej mikrocystynie o wiele łatwiej będzie dopasować się do centrum aktywnego enzymu mając w swojej strukturze *N*-metylodehydroalaninę.

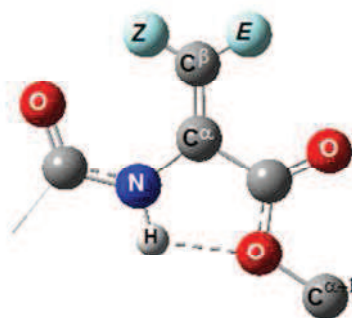
Estry α,β -dehydroaminokwasów

Kolejną modyfikacją α,β -dehydroaminokwasów występujących w naturze jest zastąpienie wiązania amidowego od strony C-końca wiązaniem estrowym. Takie połączenie elementów strukturalnych występuje w fomalidzie,^[6] tumescenamidach,^[52,53] ostreogrycynie,^[54] cyrmeninach,^[55,56] BE-22179,^[57] czy dityromycynie.^[58]

Analogicznie do poprzednich prac, zaplanowałem badania modelowych związków, estrów metylowych *N*-acetylo- α,β -dehydroaminokwasów, Ac- Δ Xaa-OMe (Δ Xaa = Δ Ala, (*Z*)- Δ Abu, (*E*)- Δ Abu, Δ Val). Za wyjątkiem dehydrowaliny, estry tych α,β -dehydroaminokwasów występują w naturze. Zastosowano metody obliczeniowe, a związki zsyntezowano i poddano analizie spektralnej metodą FT-IR. Obliczenia i syntezę modelowych związków, pod moim nadzorem i współudziale, wykonała doktorantka Justyna Grondys. Analizę FT-R wykonałem we współpracy z dr hab. Małgorzatą Brodą.

Z uzyskanych rezultatów wynika, że wyróżniającą się cechą badanych estrów α,β -dehydroaminokwasów jest konformacja β_2 o wartościach kątów $\varphi,\psi \sim -180^\circ, 0^\circ$ dla dehydroalaniny i *E*-dehydrobutyryny, oraz $\varphi,\psi \sim -120^\circ, 0^\circ$ dla dehydrowaliny i *Z*-dehydrobutyryny (Schemat 5). Obliczenia pokazują, że dla estru dehydroalaniny jest to konformacja druga w szeregu energetycznym, bez względu na symulowaną polarność otoczenia. Natomiast dla estru dehydrowaliny jest konformacją o najniższej energii dla izolowanej molekuly lub w słabo polarnym środowisku. Estry dehydrobutyryny, zarówno izomer *E*, jak i *Z*, wykazują pośrednie własności konformacyjne, z tym, że izomer *E*

ma własności bardziej podobne do estru dehydroalaniny, natomiast izomer *Z* bardziej przypomina ester dehydrowaliny.



Schemat 5. Ogólny schemat konformacji β_2 estrów α,β -dehydroaminokwasów.

Względnie niska energia konformacji β_2 wynika z występowania wewnątrzcząsteczkowego wiązania wodorowego N–H \cdots O, w którym akceptorem jest alkoksylowy atom tlenu wiązania estrowego. Potwierdzenie znaleziono w widmach FT-IR badanych związków wykonanych w tetrachlorku węgla oraz chloroformie. Położenie pasm $\nu_s(\text{N-H})$ w zakresie 3409-3455 cm^{-1} wskazuje na istnienie monomerów z wewnątrzcząsteczkowym wiązaniem wodorowym N–H \cdots O. Poza konformacją C_5 , której można przypisać pasmo $\nu_s(\text{N-H})$ w zakresie 3409-3418 cm^{-1} , widoczne jest pasmo w zakresie 3430-3455 cm^{-1} , które można przypisać konformacji posiadającej słabsze wiązanie wodorowe, konformacji β_2 . Relatywna intensywność pasm zmienia się na korzyść konformacji β_2 wraz ze wzrostem polarności rozpuszczalnika. Co więcej, pasmo od konformacji β_2 jest najintensywniejsze dla estru dehydrowaliny, a najmniej dla estru dehydroalaniny. Położenia pasm $\nu_s(\text{N-H})$ potwierdzają różnicę pomiędzy izomerami *E* i *Z*-dehydrobutyryny, oraz ich podobieństwo odpowiednio do dehydroalaniny i dehydrowaliny. Dla dehydrowaliny oraz *Z*-dehydrobutyryny, pasmo dla konformacji β_2 występuje w zakresie 3430-3440 cm^{-1} . Natomiast dla dehydroalaniny oraz *E*-dehydrobutyryny występuje w zakresie 3445-3455 cm^{-1} . Uzyskane wyniki z analizy widm FT-IR dobrze korelują z wynikami uzyskanymi metodami teoretycznymi. Przedstawione rezultaty badań zamieściłem w publikacji [H9].

W dalszych badaniach kontynuowałem analizę właściwości konformacyjnych estrów α,β -dehydroaminokwasów w bardziej polarnym środowisku, we współpracy z dr hab. Maciejem Bujakiem, korzystając z dostępnych w literaturze konformacji w kryształach oraz rentgenowskiej analizy strukturalnej zsyntezowanych związków wspartych obliczeniami. Z uzyskanych danych wynika, że dehydroalanina z wiązaniem estrowym od strony C-końca utrzymuje tendencję do przyjmowania konformacji C_5 , jest tak w przypadku otrzymanego

Ac- Δ Ala-OMe. Tym niemniej znane są z literatury przykłady, w których ester dehydroalaniny przyjmuje w kryształach konformację β_2 , czego nie spotykano dla analogów amidowych. W literaturze nie było danych dotyczących estrów dehydrobutyryny i dehydrowaliny. Tym niemniej, jeżeli weźmie się pod uwagę estry α,β -dehydroaminokwasów, bez względu na typ podstawnika w łańcuchu bocznym, a jedynie jego obecność i rodzaj izomeru geometrycznego, można zauważyć pewne tendencje. Jedyny znany dotąd ester α,β -dehydroaminokwasu z grupą nitrylową w położeniu *E* przyjmuje w stanie stałym konformację C_5 . Zatem analogicznie do przewidywanej dla dehydroalaniny oraz *E*-dehydrobutyryny. W przypadku łańcucha bocznego w położeniu *Z* lub w obu położeniach, *Z* i *E*, widoczna jest tendencja do przyjmowania konformacji α lub β (lub ich lustrzanych odpowiedników). Jest to podobne do ich amidowych analogów. Aby dostrzec różnice, za pomocą rentgenowskiej analizy strukturalnej określono konformację estru metyloвого dehydrowaliny, Ac- Δ Val-OMe, a także estru metyloвого *N*-benzyloksykarbonylo-(*Z*)-dehydrobutyryny, Cbz-(*Z*)- Δ Abu-OMe, oraz jego analogu *N'*-metyloamidu *N*-benzyloksykarbonylo-(*Z*)-dehydrobutyryny, Cbz-(*Z*)- Δ Abu-NHMe. Badania wykazały, że zarówno otrzymany ester *Z*-dehydrobutyryny, jak i ester dehydrowaliny przyjmują w kryształach konformację β . Jednak otrzymany amid *Z*-dehydrobutyryny przyjmuje konformację α , podobnie jak inne analogi znane z literatury.

Analiza sił stabilizujących te konformacje, zarówno wewnątrz- jak i międzycząsteczkowych pokazuje pewne różnice wynikające z obecności wiązania estrowego lub amidowego. W przypadku estrów α,β -dehydroaminokwasów, konformacja β jest stabilizowana przez wewnątrzcząsteczkowe wiązanie wodorowe C–H \cdots O, gdzie akceptorem jest alkoksylowy atom tlenu grupy estrowej. W przypadku konformacji β amidów α,β -dehydroaminokwasów, to wiązanie nie występuje. Przeciwnie, pojawia się odpychanie pomiędzy atomami wodoru łańcucha bocznego, a wiązania amidowego od strony C-końca. Natomiast konformacja α amidów α,β -dehydroaminokwasów jest stabilizowana dodatkowo przez wewnątrzcząsteczkowe wiązanie wodorowe N–H \cdots N, które nie występuje w analogicznej konformacji dla estrów.

Podsumowując, w polarnym środowisku, estry α,β -dehydroaminokwasów z podstawnikiem *Z* lub podstawnikami *Z* i *E*, będą miały tendencję do przyjmowania konformacji β , podczas gdy amidy α,β -dehydroaminokwasów będą miały tendencję do przyjmowania konformacji α . Efekt ten jest silniejszy dla reszty *Z*-dehydrobutyryny niż dla dehydrowaliny. Metody obliczeniowe pokazują jednak, że względne różnice energii

między konformacjami α i β są stosunkowo małe. Zatem istotne znaczenie będzie mieć budowa związku. Przedstawione wyniki zebrałem w publikacji [H10].

Na podstawie uzyskanych rezultatów badań właściwości konformacyjnych estrów α,β -dehydroaminokwasów można wyjaśnić różnice w biologicznej aktywności fomalidu oraz izofomalidu, cyklopentadepsipeptydów zawierających reszty estru dehydrobutyryny, odpowiednio izomeru *E* i *Z*. Fomalid jest selektywną fitotoksyną produkowaną przez grzyb *Leptosphaeria maculans*, patogenem roślin *Braasicas*, m.in. rzepaku, powodujący czarną narośl na łądogach (ang. blackleg) tzw. szelestnicę. Izofomalid, jego geometryczny izomer, nie wykazuje toksyczności, chociaż różnica wynika jedynie z położenia (*E* lub *Z*) grupy metylowej łańcucha bocznego dehydroaminokwasu. Jak wynika z przedstawionych badań, izomery geometryczne estru dehydrobutyryny posiadają inne tendencje w przyjmowaniu konformacji, a nawet analogiczne konformacje różnią się nieco geometrią, właśnie ze względu na zawadę steryczną grupy metylowej łańcucha bocznego w odpowiednim położeniu. Można zatem przyjąć, że odmienne preferencje konformacyjne izomerów geometrycznych mają wpływ na konformację małego cyklicznego peptydu, a w konsekwencji na jego biologiczną aktywność.

Estry α -aminokwasów

W celu potwierdzenia specyficznych właściwości estrów α,β -dehydroaminokwasów, podjąłem metodami teoretycznymi badania właściwości konformacyjnych analogu nasyconego, estru metylowego *N*-metyloalaniny, Ac-L-Ala-OMe, również w odniesieniu do modelowego związku standardowej alaniny, Ac-L-Ala-NHMe. Zanalizowałem także dostępne w bazach krystalograficznych konformacje reszt standardowych aminokwasów oraz estrów standardowych aminokwasów (za wyjątkiem glicyny i proliny). Badania te wykonałem przy pomocy magistrantki Anny Janicki. Wyniki opracowałem w formie publikacji [H11]. Po raz kolejny widoczna jest zgodność obu metod, ponieważ dystrybucja konformacji znajdujących w kryształach pokrywa się z wyliczonymi minimami powierzchni energii potencjalnych map konformacyjnych. Warto również zauważyć, że liczba konformacji przyjmowanych w kryształach odpowiada relatywnej energii danej konformacji. Wykazałem, że estry aminokwasów preferują konformację β ($\varphi,\psi \sim -78^\circ, +158^\circ$), C_5 ($\varphi,\psi \sim -138^\circ, +165^\circ$), oraz α_R ($\varphi,\psi \sim -88^\circ, -18^\circ$). Zatem mają one właściwości konformacyjne zbliżone do standardowych aminokwasów, natomiast różnią się od estrów α,β -dehydroaminokwasów.

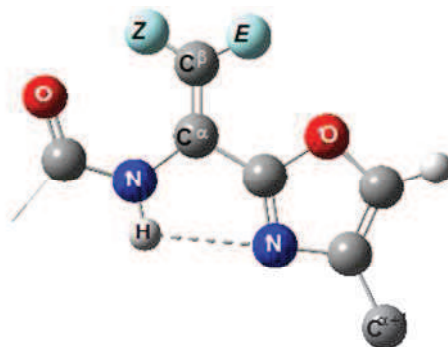
Poza celem porównawczym, przedstawione studia stanowiły część szerszych badań właściwości konformacyjnych reszt aminokwasów, a także α -hydroksykwasów, które występują w depsiptydach. Analizowałem konformacje reszt z wiązaniem estrowym od strony C-końca, N-końca, jak również z wiązaniem estrowym i jednocześnie, metylowanym wiązaniem peptydowym, zarówno od strony N-końca, jak i od strony C-końca. Wykazałem, że reszty z wiązaniem estrowym od strony N-końca mają znaczącą tendencję do przyjmowania konformacji α' ($\varphi, \psi \sim -147^\circ, -5^\circ$), stabilizowanej przez nietypowe wewnątrzcząsteczkowe wiązanie wodorowe N-H \cdots O, w którym grupa N-H pochodzi od wiązania amidowego od strony C-końca, a akceptorem jest alkoksylowy atom tlenu grupy estrowej od strony N-końca. Z kolei *N*-metyloaminokwasy z grupą estrową od strony C-końca relatywnie łatwo przyjmują konformację α_L ($\varphi, \psi \sim -52^\circ, +40^\circ$). Natomiast reszta z grupą estrową od strony N-końca i metylowaną, trzeciorzędową grupą amidową od strony C-końca preferuje konformację β ($\varphi, \psi \sim -70^\circ, +153^\circ$). Takie elementy strukturalne występują w wielu naturalnych depsiptydach, wśród których zdarzają się i takie, które w ogóle nie posiadają typowego drugorzędowego wiązania amidowego, lecz jedynie wiązania estrowe oraz metylowane wiązania amidowe.^[59]

Oksazolo- α, β -dehydroaminokwasy

Trzecim znaczącym typem modyfikacji naturalnych α, β -dehydroaminokwasów jest występowanie pierścienia oksazolowego w miejsce wiązania amidowego od strony C-końca. Takie połączenie elementów strukturalnych występuje w makrocyclicznych tiopeptydach o własnościach antybiotycznych: genintiocynie,^[60] berninamycynach,^[61] sulfomycynach,^[62] promonducynie,^[63] tiotypinie,^[64] A10255,^[65-67] tioaksamycynie,^[68] radamycynie,^[69] TP-1161,^[70] czy ostatnio poznanych mecherchamycynie^[71,72] oraz uruktapepstatynie.^[73]

Najczęściej w przyrodzie występują oksazolo-dehydroalanina oraz oksazolo-(*Z*)-dehydrobutyryna, a z aminokwasów nasyconych oxazolo-L-alanina. Właśnie te aminokwasy wybrałem do badań konformacyjnych. Jako metody badawcze zastosowano obliczenia teoretyczne modelowych związków połączone z badaniami w roztworze z użyciem technik spektralnych (NMR, FT-IR) oraz rentgenowskiej analizy strukturalnej. Obliczenia i syntezę wykonałem przy współdziałaniu doktorantki Moniki Staś, w której pracy pełnię rolę promotora pomocniczego. Analizę widm FT-IR wykonano we współpracy z dr hab. Małgorzatą Brodą, natomiast rentgenowską analizę strukturalną we współpracy z prof. Tadeuszem Lisem oraz dr hab. Maciejem Bujakiem. Wyniki zebrałem w publikacji [H12].

Rezultaty otrzymane metodami teoretycznymi pokazują, że oksazolo- α,β -dehydroaminokwasy wykazują tendencję do przyjmowania konformacji β_2 (Schemat 6).



Schemat 6. Ogólny schemat konformacji β_2 oksazolo- α,β -dehydroaminokwasów.

W porównaniu do estrów dehydroaminokwasów, które również przyjmowały konformację β_2 , tendencja oksazolo- α,β -dehydroaminokwasów jest znacznie silniejsza. Dla oksazolo-dehydroalaniny, konformacja β_2 ($\varphi, \psi \sim -180^\circ, 0^\circ$), jest konformacją o najniższej energii, bez względu na rodzaj badanego środowiska. W przypadku oksazolo-(Z)-dehydrobutyryny, konformacja β_2 ($\varphi, \psi \sim -120^\circ, 0^\circ$), jest również konformacją o najniższej energii, z tym że o nieco innej geometrii, co jest związane z zawadą steryczną wprowadzaną przez podstawnik łańcucha bocznego w pozycji Z. W przypadku oksazolo-L-alaniny tendencja do konformacji β_2 ($\varphi, \psi \sim -150^\circ, -10^\circ$) jest utrzymywana w słabo polarnym środowisku, natomiast bardziej polarne otoczenie sprzyja konformacji β ($\varphi, \psi \sim -61^\circ, +140^\circ$).

Rezultaty te potwierdzono metodami eksperymentalnymi. Położenia pasm $\nu_s(\text{N-H})$ w widmach FT-IR wykonanych w tetrachlorku węgla oraz chloroformie w zakresie $3406\text{--}3412\text{ cm}^{-1}$, wskazują na obecność konformacji stabilizowanych przez wewnątrzcząsteczkowe wiązanie wodorowe. Z obliczeń wynikało, że mogą to być dwie konformacje: C_5 z wewnątrzcząsteczkowym wiązaniem $\text{N-H}\cdots\text{O}$, w którym akceptorem jest atom tlenu pierścienia oksazolowego lub β_2 z wewnątrzcząsteczkowym wiązaniem $\text{N-H}\cdots\text{N}$, w którym akceptorem jest oksazolowy atom azotu. Rozstrzygnięcie znalazłem na podstawie widm NMR NOE w CDCl_3 oraz $\text{DMSO-}d_6$. Wykorzystałem w tym celu zależną od przyjmowanej konformacji różnicę w odległości pomiędzy atomem wodoru przy pierścieniu oksazolowym od atomu wodoru przy atomie węgla β w pozycji E łańcucha bocznego (dla dehydroaminokwasów) lub atomu wodoru α (dla pochodnej alaniny), a także od atomu wodoru grupy amidowej od strony N-końca [H12 materiały pomocnicze]. W szczególności dystans ten jest inny dla konformacji C_5 i β_2 , które różnią się zasadniczo ustawieniem pierścienia oksazolowego, o pół obrotu kąta torsyjnego ψ . Dla oksazolo-dehydroalaniny widoczna jest jedynie bliskość atomów wodoru przy pierścieniu oksazolowym oraz (E) $\text{C}\beta\text{-H}$,

zarówno w słabo polarnym chloroformie, jak i bardziej polarnym dimetylosulfotlenku. Oznacza to, że przyjmowana jest wyłącznie konformacja β_2 . Podobne wyniki uzyskano w przypadku oksazolo-(Z)-dehydrobutyryny w słabo polarnym środowisku chloroformu. W przypadku bardziej polarnego DMSO, bliskość sygnałów na widmie NMR nie pozwala na stwierdzenie czy jest to wyłącznie konformacja β_2 . Poszerzenie pasm $\nu_s(\text{N-H})$ w widmach FT-IR wskazuje jednak na obecność innych konformacji. Zatem oksazolo-(Z)-dehydrobutyryna będzie wykazywać słabszą tendencję do przyjmowania konformacji β_2 aniżeli oksazolo-dehydroalanina.

W przypadku oksazolo-L-alaniny bliskość atomów wodoru α oraz pierścienia oksazolowego w środowisku chloroformu również wskazuje na konformację β_2 . Natomiast w bardziej polarnym DMSO, widoczny jest także sygnał od wodoru amidowego, co świadczy o obecności innych konformacji. Położenie pasma $\nu_s(\text{N-H})$ w widmach FT-IR wskazuje na relatywnie słabsze wiązanie wodorowe niż w przypadku dehydroaminokwasów.

Rentgenowska analiza strukturalna konformacji w kryształach wykonana dla dwóch badanych związków, pochodnej oksazolo-(Z)-dehydrobutyryny oraz oksazolo-DL-alaniny, pokazuje, że przyjmują one odpowiednio konformację β ($\varphi, \psi = -62,47(18)^\circ, 160,07(14)^\circ$) oraz α' ($\varphi, \psi = -143,41(17)^\circ, -128,9(2)^\circ$). Konformacje te zostały przewidziane metodami teoretycznymi.

Na podstawie zebranych wyników można sądzić, że tendencja do przyjmowania konformacji β_2 maleje wraz ze wzrostem polarności otoczenia. Zależy jednak od rodzaju reszty aminokwasowej. Silniejszą tendencję przejawiają oksazolo- α, β -dehydroaminokwasy, szczególnie oksazolo-dehydroalanina. Natomiast o wiele słabszą wykazuje jej nasycony analog. Analiza konformacyjna pochodnych alaniny pokazuje, że konformacja β_2 występuje dla standardowych aminokwasów, i jest stabilizowana przez wewnątrz-cząsteczkowe wiązanie $\text{N-H}\cdots\text{N}$.^[74] Ma jednak znacząco wyższą energię i nie występuje w bardziej złożonych związkach.^[75] Analogicznie jest w przypadku α, β -dehydroaminokwasów [H7]. Dla estrów α, β -dehydroaminokwasów, jak wspomniano wcześniej, jest konformacją o niskiej energii, ale nie w takim stopniu jak dla oksazolo-aminokwasów.

Przyczyną przyjmowania przez oksazolo- α, β -dehydroaminokwasy konformacji β_2 , a nie konformacji C_5 , jest charakter akceptora wewnątrzcząsteczkowego wiązania wodorowego $\text{N-H}\cdots\text{O}$ oraz $\text{N-H}\cdots\text{N}$, który pełnią heteroatomy pierścienia oksazolowego. Dane literaturowe wskazują, że atom tlenu pierścienia oksazolowego jest słabszym akceptorem wiązania wodorowego aniżeli atom azotu.^[76-79] Stąd też konformacja β_2 z wewnątrzcząsteczkowym wiązaniem wodorowym $\text{N-H}\cdots\text{N}$ jest silniej stabilizowana aniżeli

konformacja C_5 z wiązaniem $N-H\cdots O$. Dlatego w niepolarnym lub słabo polarnym środowisku jest to konformacja o najniższej energii. Wzrost polarności otoczenia sprzyja uzyskiwaniu stabilizacji przez silniejsze oddziaływania międzycząsteczkowe, które angażują te same grupy funkcyjne, co oddziaływania wewnątrzcząsteczkowe. Dlatego w kryształach przyjmowane są inne konformacje niż β_2 . Jednak oksazolo- α,β -dehydroaminokwasy ciągle mają większą tendencję do przyjmowania konformacji β_2 . Ma to związek z możliwym sprzężeniem π -elektronowym obejmującym wiązanie podwójne, pierścień oksazolowy, a w przypadku dehydroalaniny, także grupę amidową od strony N-końca. Nie bez znaczenia jest również możliwość tworzenia wiązań wodorowych $C^\beta-H\cdots O$ z udziałem atomów wodoru grupy metylenowej łańcucha bocznego. Współistnienie tak wielu sił stabilizujących konformację β_2 oksazolo-dehydroalaniny wyjaśniałoby jej utrzymywanie, nawet w polarnym otoczeniu, ponieważ zysk energetyczny wynikający z oddziaływań wewnątrzcząsteczkowych przekracza ten z potencjalnych oddziaływań międzycząsteczkowych.

Potwierdzeniem tendencji oksazolo- α,β -dehydroaminokwasów do konformacji β_2 są dane z literatury. Oksazolo-dehydroalanina w mercherchamycynie przyjmuje kąty torsyjne ($\varphi,\psi = 179,18^\circ, -0,34^\circ$), co odpowiada konformacji $-\beta_2$.^[71] Również oksazolo-(Z)-dehydrobutyryna w urukthapelstatynie A przyjmuje kąty torsyjne ($\varphi,\psi = 111,08^\circ, -7,73^\circ$), co odpowiada konformacji $-\beta_2$.^[73] Także w przypadku nasyconych oksazolo-aminokwasów przyjmowana jest konformacja $\beta_2/-\beta_2$.^[80-85] Należy jednakże zauważyć, że są to związki cykliczne, zatem na przyjmowanie takiej konformacji mogą mieć wpływ ograniczenia steryczne.

Perspektywy

W przedłożonym cyklu jednotematycznych prac zbadano jedynie najczęściej występujące modyfikacje dehydropeptydów w obrębie łańcucha głównego z udziałem α,β -dehydroaminokwasów. Do zbadania pozostają jeszcze rzadziej występujące inne modyfikacje, na przykład obecność pierścienia tiazolowego czy tiazolinowego od strony C-końca. Wstępne badania zostały przedstawione w formie wystąpień konferencyjnych (załącznik 6). W naturze można znaleźć również kombinacje przedstawionych modyfikacji strukturalnych: α,β -dehydroaminokwasy z metylovanym wiązaniem amidowym od strony N-końca oraz grupą estrową lub tioestrową od strony C-końca [H1]. Należy przypuszczać, że tak zmodyfikowane dehydroaminokwasy będą wykazywały odmienne właściwości

konformacyjne, chociażby ze względu na ograniczoną zdolność do tworzenia wiązań wodorowych, co może jednak też stanowić spore utrudnienie w ich badaniu.

Kolejnym kierunkiem badań jest określenie wpływu polarnej grupy funkcyjnej w łańcuchu bocznym na właściwości konformacyjne α,β -dehydroaminokwasów. Dotychczasowa wiedza obejmuje zasadniczo przede wszystkim dehydrofenyloalaninę, rzadziej dehydroalaninę, dehydrobutyrynę, czy dehydrowalinę. Tymczasem w przyrodzie istnieją α,β -dehydroaminokwasy o innych, czasem znacznie rozbudowanych łańcuchach bocznych [H1]. Wstępne badania prowadzone w ramach prac magisterskich, których jestem promotorem, pokazują, że bardzo istotny może być wpływ grup funkcyjnych łańcucha bocznego. Przykładowo, grupa N–H w przy atomie węgla β w ureido-dehydroalaninie całkowicie zmienia jej preferencje konformacyjne w stosunku do obecnie badanych α,β -dehydroaminokwasów, generując nietypowe konformacje, trudno dostępne dla standardowych aminokwasów.^[86] Obiecujące rezultaty uzyskano badając właściwości konformacyjne dehydrohistydyny, w której sam obrót pierścienia imidazolowego w łańcuchu bocznym może w istotny sposób wpływać na konformacje łańcucha głównego.^[87]

Z przedstawionych badań wynika, że modyfikacje α,β -dehydroaminokwasów generują specyficzne właściwości konformacyjne. Takie elementy strukturalne mogą zatem być stosowane jako element projektowanych peptydów, w których daną własność konformacyjną uważałoby się za pożądaną. Jednym z kierunków planowanych badań jest włączenie badanych elementów strukturalnych w łańcuch peptydowy. Stosowane dotychczas modelowe związki były proste, chociaż właśnie ze względu na swoją prostotę były odpowiednie do badań konformacyjnych. Obecnie trwają prace nad pochodnymi oksazolo- α,β -dehydroaminokwasów z grupą ochronną Fmoc lub Boc od strony N-końca. Ponieważ reszta dehydroaminokwasu nie sprzyja efektywności reakcji sprzęgania, jak również jest wrażliwa na warunki reakcji (szczególnie dehydroalanina), planowane jest wprowadzenie grupy selanylowej w łańcuchu bocznym,^[88] a następnie odtworzenie z niej dehydroaminokwasu w końcowym etapie. Obiecujące rezultaty może przynieść synteza oksazolo- α,β -dehydroaminokwasów poprzez reakcję Hantzsch'a.^[89] Wydaje się, że ten sposób będzie szczególnie odpowiedni w syntezie oksazolo-dehydrofenyloalaniny, która powinna być bardziej stabilna w warunkach reakcji, a dodatkowo daje możliwość uzyskania we względnie prosty sposób przez fotoizomeryzację izomeru geometrycznego *E* [H5].

Zasadniczo, w dalszej perspektywie, planowane jest opisanie właściwości konformacyjnych wszystkich α,β -dehydroaminokwasów występujących w naturze.

Literatura cytowana

- [1] Thormann M, Hofmann H-J (1998) *J Mol Struct THEOCHEM* **431**: 79-96.
- [2] Goldberg J, Huang H-B, Kwon Y-G et al (1995) *Nature* **376**: 745-753.
- [3] Dugave C, Demange L (2003) *Chem Rev* **103**: 2475-2532.
- [4] Latajka R, Makowski M, Jewgiński M et al. (2006) *New J Chem* **30**: 1009-1018.
- [5] Rich DH, Bhatnagar PK (1978) *J Am Chem Soc* **100**: 2212-2218.
- [6] Ward DE, Vazquez A, Pedras MSC (1999) *J Org Chem* **64**: 1657-1666.
- [7] Bonnard I, Rolland M, Salmon JM et al (2007) *J Med Chem* **50**: 1266-1279.
- [8] Chakor NS, Dallavalle S, Musso L et al (2012) *Tetrahedron Lett* **53**: 228-231.
- [9] Humphrey JM, Chamberlin RA (1997) *Chem Rev* **97**: 2243-2266.
- [10] Noda K, Shimohigashi Y, Izumiya N (1983) *The peptides* **5**: 285-339.
- [11] Givot IL, Smith TA, Abeles RH (1969) *J Biol Chem* **244**: 6341-6353.
- [12] Hanson KR, Havir EA (1970) *Archiv Biochem Biophysics* **141**: 1-17.
- [13] Chatterjee C, Paul M, Xie L, van der Donk WA (2005) *Chem Rev* **105**: 633-683.
- [14] Bierbaum G, Sahl H-G (2009) *Curr Pharm Biotechnol* **10**: 2-18.
- [15] Dischinger J, Wiedemann I, Bierbaum G et al (2013) Handbook of Biologically Active Peptides Chapter 19 – Lantibiotics pp 119–128. Elsevier, London.
- [16] Bagley MC, Dale JW, Merritt EA et al (2003) *Chem Rev* **105**: 685-714.
- [17] Just-Baringo X, Albericio F, Álvarez M (2014) *Mar Drugs* **12**: 317-351.
- [18] Łukomska J, Kasprzykowski F, Łankiewicz L, Grzonka Z (2002) *Wiad Chem* **56**: 57-82.
- [19] Welker M, von Dohren H (2006) *FEMS Microbiol Rev* **30**: 530–563.
- [20] Namikoshi M, Rinehart KL, Sakai R et al (1992) *J Org Chem* **57**: 866-872.
- [21] Namikoshi M, Choi BW, Sun F et al (1993) *Chem Res Toxic* **6**: 151-158.
- [22] Foulke-Abel J, Agbo H, Zhang H et al (2011) *Nat Prod Rep* **28**: 693-704.
- [23] Liebermann B, Ellinder R, Pinet E (1996) *Phytochemistry* **42**: 1537-1540.
- [24] Wang W-L, Lu Z-Y, Tao H-W et al (2007) *J Nat Prod* **70**: 1558–1564.
- [25] Miyamae A, Fujioka M, Koda S et al (1989) *J Chem Soc Perkin Trans 1* **5**: 873-878.
- [26] Taniguchi M, Suzumura K-I, Nagai K et al (2004) *Bioorg Med Chem* **12**: 3125-3133.
- [27] Meyer WL, Templeton GE, Grable CI et al (1975) *J Am Chem Soc* **97**: 3802-3809.
- [28] Plaza A, Bifulco G, Masullo M et al (2010) *J Org Chem* **75**: 4344-4355.
- [29] Smełka L, Rzeszotarska B, Broda MA, Kubica Z (1997) *Org Prep Proc Int* **29**: 696–701.
- [30] Rich DH, Tam JP (1977) *J Org Chem* **42**: 3815-3820.
- [31] Broda MA, Rzeszotarska B, Smełka L et al (1997) *J Pept Res* **50**: 342-351.
- [32] Broda MA, Rzeszotarska B, Smełka L et al (1998) *J Pept Res* **52**: 72-79.
- [33] Broda MA, Siodłak D, Rzeszotarska B (2005) *J Pept Sci* **11**: 546-555.
- [34] Grindley BT (1982) *Tetrahedron Lett* **23**: 1757–1760.
- [35] Pawar DM, Khalil AA, Hooks DR et al (1998) *J Am Chem Soc* **120**: 2108–2112.
- [36] Aguirre G, Somanathan R, Hellberg LH et al (2003) *Magn Reson Chem* **41**: 131–134.
- [37] Groth G (2002) *PNAS* **99**: 3464–3468.
- [38] Kelker MS, Page R, Petit W (2009) *J Mol Biol* **385**: 11–21.
- [39] Ragusa MJ, Dancheck B, Critton DA et al (2010) *Nat Struct Mol Biol* **17**: 459–464.
- [40] Annala A, Lehtimäki J, Mattila K et al (1996) *J Biol Chem* **271**: 16695–16702.
- [41] Bagu JR, Sonnichsen FD, Williams D et al (1995) *Nat Struct Biol* **2**: 114–116.
- [42] Cho US, Xu W (2007) *Nature* **445**: 53–57.
- [43] Xu Y, Chen Y, Zhang P et al (2008) *Mol Cell* **31**: 873–885.
- [44] Allen FH (2002) *Acta Cryst B* **58**: 380.
- [45] Möhle K, Hofmann H-J (1998) *J Pept Res* **51**: 19-28.
- [46] Aurelio L, Brownlee RTC, Hughes AB (2004) *Chem Rev* **104**: 5823-5846.
- [47] Crisma M, Formaggio F, Toniolo C et al (1999) *J Am Chem Soc* **121**: 3272-3278.
- [48] Pietrzyński G, Rzeszotarska B, Ciszak E et al (1996) *Int J Pept Protein Res* **48**: 347-356.
- [49] Palmer DE, Pattaroni C, Nunami K et al (1992) *J Am Chem Soc* **114**: 5634–5642.
- [50] Pascard C, Ducruix A, Lunel J et al (1977) *J Am Chem Soc* **99**: 6418–6423.

- [51] Schaeffer DJ, Hooser SB, Haschek WM et al (1989) *J Environ Pathol Toxicol Oncol* **9**: 221–238.
- [52] Motohashi K, Toda T, Sue M et al (2010) *J Antibiot* **63**: 549–552.
- [53] Kishimoto S, Tsunematsu Y, Nishimura S et al (2012) *Tetrahedron* **68**: 5572–5578.
- [54] Durant F, Evrard G, Declercq JP et al (1974) *Cryst Struct Comm* **3**: 503–510.
- [55] Sasse F, Leibold T, Kunze B et al (2003) *J Antibiot* **56**: 827–831.
- [56] Leibold T, Sasse F, Reichenbach H et al (2004) *Eur J Org Chem* **2**: 431–435.
- [57] Boger DL, Ichikawa S (2000) *J Am Chem Soc* **122**: 2956–2957.
- [58] Teshima T, Nishikawa M, Kubota I et al (1988) *Tetrahedron Lett* **29**: 1963–1966.
- [59] Ballard CE, Yu H, Wang B (2002) *Curr Med Chem* **11**: 1309–1332.
- [60] Yun B-S, Hidaka T, Furihata K et al (1994) *J Antibiot* **47**: 969–975.
- [61] Kodani S, Ninomiya A (2013) *Asian J Chem* **25**: 490–492.
- [62] Vijaya Kumar EKS, Kenia J, Mukhopadhyay T et al (1999) *J Nat Prod* **62**: 1562–1564.
- [63] Yun BS, Seto H (1995) *Biosci Biotechnol Biochem* **59**: 876–880.
- [64] Yun B-S, Hidaka T, Furihata K et al (1994) *Tetrahedron* **50**: 11659–11664.
- [65] Boeck LD, Berry DM, Mertz FP et al (1992) *J Antibiot* **45**: 1222–1230.
- [66] Debono M, Molloy RM, Occolowitz JL et al (1992) *J Org Chem* **57**: 5200–5208.
- [67] Favret ME, Paschal JW, Elzey TK et al (1992) *J Antibiot* **45**: 1499–1511.
- [68] Yun B-S, Hidaka T, Furihata K et al (1994) *J Antibiot* **47**: 1541–1545.
- [69] Castro Rodríguez J, Holgado GG, Santamaría Sánchez RI et al (2002) *J Antibiot* **55**: 391–395.
- [70] Engelhardt K, Degnes KF, Kemmler M et al (2010) *Appl Environ Microbiol* **76**: 4969–4976.
- [71] Kanoh K, Matsuo Y, Adachi K et al (2005) *J Antibiot* **58**: 289–292.
- [72] Hernández D, Altuna M, Cuevas C et al (2007) *J Med Chem* **51**: 5722–5730.
- [73] Matsuo Y, Kanoh K, Imagawa H et al (2007) *J Antibiot* **60**: 256–260.
- [74] Vargas R, Garza J, Hay BP et al (2002) *J Phys Chem A* **106**: 3213–3218.
- [75] Tsai I-HM, Xu Y, Dannenberg JJ (2009) *J Phys Chem B* **113**: 309–318.
- [76] Tanzi L, Ramondo F, Guidoni L (2012) *J Phys Chem A* **116**: 10160–10171.
- [77] McDonald NA, Jorgensen WL (1998) *J Phys Chem B* **102**: 8049–8059.
- [78] Kaur D, Khanna S (2011) *Comput Theor Chem* **963**: 71–75.
- [79] Kaur D, Khanna S (2010) *J Mol Struct THEOCHEM* **949**: 14–22.
- [80] Dong Y, Loong DTJ, Yuen AKL et al (2012) *Supramol Chem* **24**: 508–519.
- [81] Young PG, Clegg JK, Bhadbhade M et al (2011) *Chem Commun* **47**: 463–465.
- [82] Haberhauer G, Rominger F (2003) *Eur J Org Chem* **16**: 3209–3218.
- [83] Todorova AK, Jüttner F, Linden A et al (1995) *J Org Chem* **60**: 7891–7895.
- [84] You S-L, Kelly JW (2005) *Tetrahedron* **61**: 241–249.
- [85] Haberhauer G, Drosdow E, Oeser T et al (2008) *Tetrahedron* **64**: 1853–1859.
- [86] Stochliński P. Praca magisterska. Opole, 2013.
- [87] Kołodziejczyk A. Praca magisterska. Opole, 2014.
- [88] Okeley NM, Zhu Y, van der Donk WA (2000) *Org Lett* **2**: 3603–3606.
- [89] Nagaya A, Yamagishi Y, Yonezawa Y et al (2012) *Heterocycles* **85**: 313–331.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Pozostałe osiągnięcie naukowo-badawcze stanowi dziewięć niżej wymienionych publikacji, niewchodzących w skład osiągnięcia naukowego, opublikowanych po uzyskaniu stopnia doktora nauk chemicznych:

- N1. Broda, M. A.; Siodłak, D.; Rzeszotarska, B. Conformational investigation of α,β -dehydropeptides. XV. *N*-Acetyl- α,β -dehydroamino acid *N',N'*-dimethylamides: Conformational properties from infrared and theoretical studies. *J. Pept. Sci.* **2005**, *11*, 546–555. DOI: 10.1002/psc.655
- N2. Broda, M. A.; Rospenk, M.; Siodłak, D.; Rzeszotarska, B. Association of model peptides and dehydropeptides: *N*-acetyl-L-alanine- and dehydroalanine *N',N'*-dimethylamides. *J. Mol.*

- Struct.* **2005**, 740, 17–24. DOI: 10.1016/j.molstruc.2004.12.045
- N3. Broda, M. A.; Siodłak, D.; Rzeszotarska, B. Conformational investigation of α,β -dehydropeptides. XIV. *N*-Acetyl (*E*)-dehydrophenylalanine *N'*-methylamide: Conformational properties from infrared and theoretical studies. *J. Pept. Sci.* **2005**, 11, 235–244. DOI: 10.1002/psc.601
- N4. Broda, M. A.; Buczek, A.; Siodłak, D.; Rzeszotarska, B. The effect of β -methylation on the conformation of α,β -dehydro-phenylalanine. *J. Pept. Sci.* **2009**, 15, 465–473. DOI: 10.1002/psc.1137
- N5. Ochędzan-Siodłak, W.; Dziubek, K.; Siodłak, D. Biphasic ethylene polymerisation using 1-*n*-alkyl-3-methylimidazolium tetrachloroaluminate ionic liquid as a medium of the Cp_2TiCl_2 titanocene catalyst. *Eur. Polym. J.* **2008**, 44, 3608–3614. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2008.08.037
- N6. Ochędzan-Siodłak, W.; Dziubek, K.; Siodłak, D. Densities and viscosities of imidazolium and pyridinium chloroaluminate ionic liquids. *J. Mol. Liq.* **2013**, 177, 85–93. DOI: 10.1016/j.molliq.2012.10.001
- N7. Man, D.; Broda, M. A.; Buczek, A.; Kawecka, A.; Siodłak, D. The influence of selected amino acids on the dynamic properties of the liposome membranes: ESR study. *Nukleonika (Inter. J. Nucl. Res.)* **2013**, 58, 443–446.
- N8. Wałęsa, R.; Ptak, T.; Siodłak, D.; Kupka, T.; Broda, M. A. Experimental and theoretical NMR studies of interaction between phenylalanine derivative and egg yolk lecithin. *Magn. Reson. Chem.* **2014**, 52, 298–305. DOI: 10.1002/mrc.4064
- N9. Siodłak, D.* Building molecular models using screw-on bottle caps. *J. Chem. Edu.* **2013**, 90, 1247–1249. DOI: 10.1021/ed400126p

Publikacje te można podzielić na następujące grupy.

Pierwszą grupę [N1,N2] stanowią publikacje dotyczące badań konformacji oraz asocjacji modelowych związków *N',N'*-dimetyloamidów dehydroaminokwasów. Są one kontynuacją badań objętych pracą doktorską. Oparte były na związkach, które zsyntezowałem. Uczestniczyłem również w dyskusji wyników.

Druga grupa [N3,N4] to prace z obszaru zainteresowań badawczych naszego zespołu, konformacyjnych właściwości dehydroaminokwasów, w którym miałem od wykonania określone zadania. Zasadniczo polegały one na opracowaniu metodami obliczeniowymi pewnej części badań.

Trzecią grupę [N5,N6] stanowią pracę dotyczące syntezy chloroglinianowych cieczy jonowych jako medium katalizatorów do polimeryzacji etylenu. Tematyka tych badań należy do mojej małżonki, dr Wioletty Ochędzan-Siodłak. Pracujemy w tej samej jednostce, Wydziale Chemii UO, jednak w innych zespołach badawczych. Naturalna jest zatem nasza współpraca w pewnym zakresie. Mój wkład w publikacje polegał na modyfikacji metody syntezy wybranych cieczy jonowych, o szczególnej czystości, przydatnej m.in. w celu określenia ich cech fizycznych, jak również koncepcji ujęcia ich w osobną pracę. Ciekawą rzeczą było połączenie warsztatu stosowanego w syntezie organicznej ze specyfiką pracy w warunkach bezwodnych i beztlenowych stosowanej w polimeryzacji z udziałem

katalizatorów metallocenowych. Część prac była realizowana w ramach projektu badawczego Nr N N209 335337 (2009-10-22; 2012-04-21) pt. „Dwufazowa polimeryzacja etylenu wobec katalizatorów metallocenowych immobilizowanych w cieczach jonowych”, w którym byłem jednym z wykonawców (załącznik nr 6).

Czwartą grupę [N7,N8] stanowią badania interakcji modelowych związków z lecytyną. Dostarczyłem modelowe związki, które zostały przeze mnie zsyntezowane. Wyodrębniłem też lecytynę ze źródeł naturalnych, o czystości odpowiedniej do badań. W tym celu zmodyfikowałem w pewnym stopniu procedury znane z literatury.

Ostatnia praca [N9] jest z obszaru dydaktyki chemii. Dotyczy ona opracowania metody konstrukcji trójwymiarowych modeli związków chemicznych z plastikowych nakrętek. Pomysł powstał podczas prowadzenia zajęć na studiach podyplomowych dla przyszłych nauczycieli chemii i od razu znalazł zastosowanie w praktyce. Pomysł wydaje się być trywialny, ale wcale taki nie jest, ponieważ polegał na wykorzystaniu własności fizycznych polietylenu oraz opracowaniu metody łączenia. Praca została opublikowana w *Journal of Chemical Education* i ze wszystkich publikacji dała mi najwięcej satysfakcji. Metoda jest dalej ulepszana.

Wykaz opublikowanych prac naukowych oraz informacje o osiągnięciach dydaktycznych, współpracy naukowej i popularyzacji nauki jest przedstawiony w załączniku nr 6.

David Siodlak